



UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA

La Universidad Católica de Loja

TITULACIÓN DE INGENIERO QUÍMICO

Optimización de parámetros para la biooxidación de minerales polimetálicos del distrito minero Portovelo

Trabajo de Fin de Titulación

AUTOR:

Díaz Banegas Esvar Darío

DIRECTORA:

Aguirre Chamba Paulina Isabel, Ing.

**LOJA-ECUADOR
2012**

CERTIFICACIÓN

Ingeniera

Paulina Isabel Aguirre Chamba

DIRECTORA DEL TRABAJO DE FIN DE TITULACIÓN

CERTIFICA:

Que el presente trabajo denominado: “Optimización de parámetros para la biooxidación de minerales polimetálicos del distrito minero Portovelo”, realizado por Esvar Darío Díaz Banegas, cumple con todos los requisitos establecidos en las formas generales para la Graduación en la Universidad Técnica Particular de Loja, por lo cual me permito autorizar su presentación para los fines pertinentes.

Loja, septiembre de 2012

.....
Ing. Paulina Isabel Aguirre Chamba

C.I 1104265226

CESIÓN DE DERECHOS

Yo, Esva Darío Díaz Banegas, declaro ser autor del presente trabajo y eximo expresamente a la Universidad Técnica Particular de Loja y a sus representantes legales de posibles reclamos o acciones legales.

Adicionalmente declaro conocer y aceptar la disposición del Art. 67 del Estatuto Orgánico de la Universidad Técnica Particular de Loja que en su parte pertinente textualmente dice: “forman parte del patrimonio de la Universidad la propiedad intelectual de investigaciones, trabajos científicos o técnicos y tesis de grado que se realicen a través, o con el apoyo financiero, académico o institucional (operativo) de la Universidad”.

.....
Autor: Esva Darío Díaz Banegas

C.I. 1104201593

AGRADECIMIENTO

Gracias a Dios.

La presente Tesis es un esfuerzo en el cual, directa o indirectamente, participaron varias personas: leyendo, opinando, corrigiendo, teniéndome paciencia, dando ánimo, acompañando en los momentos de crisis y en los momentos de felicidad.

Agradezco a la Ing. Paulina Aguirre por haber confiado en mi persona, por la paciencia y por la dirección de este trabajo, por los consejos, la ayuda constante y el ánimo que me brindó durante la realización del mismo.

Doy las gracias a toda mi familia, especialmente a mis padres por hacer de mí una mejor persona a través de su ejemplo de honestidad y entereza, por lo que siempre han sido una guía a lo largo de mi vida. A Lily, a más de ser mi hermana, es mi amiga y pilar fundamental en vida. A mi tío Medardo, por su apoyo, por ser mi gran ejemplo y consejero.

Así mismo un agradecimiento sincero a todas las personas que me brindaron su ayuda desinteresada y aportaron con su conocimiento para la consecución de este proyecto, Ing. Alberto Aguirre, Ing. James Calva, Ing. Víctor Sanmartín, Lic. Galo Ojeda, a mis amigos(as) de laboratorio: Abigail, Denessi, Johana y Xavier.

Finalmente, gracias a mis amigos, amigas y todas aquellas personas que han sido importantes para mí durante todo este tiempo.

Esvar

INDICE DE CONTENIDOS

1.	FIN, PROPÓSITO Y COMPONENTES DEL PROYECTO	1
2.	INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES	2
2.2.	ANTECEDENTES	4
2.2.1.	ANTECEDENTES GENERALES	4
2.3.	REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	5
2.3.1.	BIOOXIDACIÓN DE MINERALES	5
2.3.2.	MECANISMOS DE BIOOXIDACIÓN	5
2.3.3.	CARACTERIZACIÓN DEL MINERAL DE PORTOVELO	9
2.3.4.	BACTERIAS INVOLUCRADAS EN BIOOXIDACIÓN (<i>ACIDITHIOBACILLUS FERROOXIDANS</i>)	10
2.3.5.	PARÁMETROS IMPORTANTES EN EL PROCESO DE BIOOXIDACIÓN	11
2.3.6.	ASPECTOS CINÉTICOS.	16
2.3.7.	CIANURACIÓN	17
3.	METODOLOGÍA	18
3.1.	MICROORGANISMOS	18
3.2.	MUESTREO Y PREPARACIÓN DE MUESTRAS	18
3.3.	ADAPTACIÓN DEL INÓCULO EN MEDIO MINERAL	19
3.4.	ENSAYOS DE BIOLIXIVIACIÓN	19
3.4.1.	DETERMINACIÓN DE pH Y EH	20
3.4.2.	DETERMINACIÓN DEL NÚMERO DE BACTERIAS	20
3.4.3.	DETERMINACIÓN DE Fe^{+2} Y DE HIERRO TOTAL	21
3.4.4.	DETERMINACIÓN DE SULFATO	21
3.4.5.	DETERMINACIÓN DE LA PRODUCTIVIDAD VOLUMÉTRICA MÁXIMA	22
3.5.	ENSAYOS DE CIANURACIÓN	22
3.6.	DISEÑO EXPERIMENTAL Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO	22
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	24

4.1.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO-----	24
4.2.	DETERMINACIÓN DE LA MEJOR CONCENTRACIÓN DE INÓCULO DEL CONSORCIO BACTERIANO PORTOVELO.-----	25
4.2.1.	LIXIVIACIÓN DE HIERRO -----	25
4.2.2.	PERFIL DE OXIDACIÓN-----	27
4.2.3.	LIXIVIACIÓN DE AZUFRE -----	28
4.2.4.	pH y EH -----	29
4.2.5.	PRODUCTIVIDAD -----	30
4.3.	DETERMINACIÓN DE LA MEJOR CONCENTRACIÓN DE INDUCTOR (Fe ⁺²) DEL CONSORCIO BACTERIANO PORTOVELO. -----	32
4.3.1.	LIXIVIACIÓN DE HIERRO Y SULFATO-----	32
4.3.2.	PRODUCTIVIDAD -----	34
4.3.3.	GRADO DE EXTRACCIÓN-----	36
4.4.	ENSAYOS DE CIANURACIÓN PARA RECUPERACIÓN DE ORO-----	37
5.	CONCLUSIONES -----	39
6.	RECOMENDACIONES -----	40
7.	BIBLIOGRAFÍA -----	41
8.	ANEXOS -----	44

RESUMEN

Palabras claves: biooxidación, inóculo, inductor, productividad

El objetivo de esta investigación fue determinar los valores óptimos para biooxidación como son concentración de inóculo y concentración de inductor (Fe^{+2}) para la lixiviación de sulfuros polimetálicos y conseguir la mejor recuperación de oro de los minerales biolixiviados. Se utilizaron microorganismos *Acidithiobacillus ferrooxidans* nativos. Se realizaron pruebas en el laboratorio a 5 %, 10 %, 15 % y 20 % V/V de concentración de inóculo y cuatro concentraciones de inductor (Fe^{+2}) como: 2, 4, 6 y 8 g/L

Los resultados obtenidos luego de los ensayos de biooxidación fueron: la mejor productividad volumétrica (Q_p) fue de 0,241 g/Ldía para hierro y 0,295 g/Ldía para sulfatos. El mejor grado de extracción de hierro que se logró encontrar es de 42 % con los parámetros ensayados. Los rendimientos de oro luego que las muestras fueron biooxidadas son cercanos al 68 % de recuperación.

1. FIN, PROPÓSITO Y COMPONENTES DEL PROYECTO

FIN

Esta investigación está dirigida para aportar al desarrollo sustentable del país, con lo que se pretende mejorar los procesos de beneficio de minerales en las zonas mineras del sur del Ecuador, así como ofrecer una alternativa amigable al ambiente. Con este estudio se está contribuyendo en la optimización del proceso de biooxidación de minerales auríferos refractarios de oro para una eficiente recuperación de metales, que pueda ser aplicable a la minería en pequeña escala, como pre-tratamiento a la cianuración, o como un post-tratamiento a los desechos sólidos de la minería y que aún pueden contener cantidades importantes de oro.

PROPÓSITO

Optimizar los parámetros para la biooxidación de minerales polimetálicos del distrito minero Portovelo.

COMPONENTES

-  Determinar de la mejor concentración de inóculo del consorcio bacteriano Portovelo.

-  Determinar de la mejor concentración de inductor (Fe^{+2}) para la lixiviación de sulfuros polimetálicos.

-  Obtener de la mejor recuperación de Oro de los minerales biolixiviados.

2. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

2.1. INTRODUCCIÓN

La biooxidación de minerales es un proceso de impacto reciente que durante miles de años las bacterias han llevado a cabo, puesto que habitan en los más variados lugares del planeta, siendo los depósitos minerales sólo uno más de estos hábitats.

Los minerales refractarios de oro, requieren de un proceso previo a la extracción del metal que sirve para aumentar el rendimiento de recuperación de oro. Existen algunas alternativas tanto físicas y biológicas como por ejemplo: la oxidación a alta presión, la tostación y la oxidación biológica. Ésta última ha tenido gran relevancia debido a que es una tecnología limpia, que involucra el reciclaje de materiales y minimización de residuos.¹

La biooxidación de minerales de oro es un proceso mediante se facilita la recuperación de pequeñas partículas de oro insertadas en la matriz de mineral sulfurado sean accesibles a la cianuración, posibilitando así la recuperación del oro, utilizando microorganismos. Las ventajas de los procesos de tratamientos microbiológicos de minerales en comparación con los procesos piro-metalúrgicos, son evidentes: se hace posible el procesamiento económico de minerales de baja ley o de materias residuales, no provoca polución al aire ni al suelo si se utiliza apropiadamente, y es de fácil operación adaptable a automatización.

En los minerales piríticos, como pirita y la arsenopirita, se encapsula el oro, haciéndolo inaccesible a lixiviantes tales como cianuro y tiourea. La oxidación parcial de la pirita y la arsenopirita desenmascara el oro lo suficientemente para la extracción, y al mismo tiempo, disminuye el consumo no específico e irreversible de cianuro durante la subsecuente extracción del oro, es por ello el gran aumento de la investigación de los aspectos básicos de bioquímica, fisiología y genética de los microorganismos lixiviantes, junto con factores de ingeniería tales como cinéticas de crecimiento y lixiviación, procesos de transferencia de masa y modalidad de operación.

Desde que se hizo el aislamiento y caracterización de *Thiobacillus ferrooxidans*, la primera bacteria conocida capaz de oxidar minerales, se comenzó a prestar atención a los nuevos

microorganismos con características de existir y proliferar en ambientes extremos de pH y concentración de metales.²

Es por ello que este trabajo comprende un estudio del proceso de biooxidación llevado a cabo con mineral del distrito minero Zaruma-Portovelo; que es un depósito de sulfuros polimetálicos. En la actualidad la operación de estos procesos tradicionales vinculados a la pequeña minería es de 1800 toneladas de mineral al día, lo cual genera desechos minerales que contienen aún importantes concentraciones de oro refractario.³

El área de Biotecnología Microbiana y Biominería actualmente perteneciente a la Sección de Ingeniería de Procesos del Departamento de Química se encuentra estudiando desde el 2009 la aplicación de la biooxidación para el aprovechamiento de yacimientos auríferos refractarios bajo un modelo de gestión: Biominería para el aprovechamiento de los recursos no renovables del sur del Ecuador y con este estudio pretende continuar con las experiencias para determinar los parámetros óptimos en el proceso de biooxidación de minerales auríferos refractarios.

Dentro de los objetivos planteados en esta investigación se tiene:

- Determinar la mejor concentración de inóculo del consorcio bacteriano Portovelo, en cuatro concentraciones diferentes. (5, 10, 15, 20 % V/V)
- Determinar la mejor concentración de inductor (Fe^{+2}) para la lixiviación de sulfuros polimetálicos variando en cuatro concentraciones. (2,4, 6 y 8 g/L Fe^{+2})
- Conseguir la mejor recuperación de Oro de los minerales biolixiviados mediante el proceso de cianuración.

2.2. ANTECEDENTES

2.2.1. ANTECEDENTES GENERALES

El uso de la biotecnología para la recuperación de metales valiosos, a partir de residuos generados por la minería, podría tener un gran impacto sobre esta industria, a la vez que se generarían nuevas oportunidades económicas. Dentro de los principales beneficios de la lixiviación bacteriana es su bajo costo y menor contaminación ambiental en comparación con procesos mineros tradicionales.⁴

El uso de microorganismos nativos hierro-oxidantes, entre los que se ha identificado principalmente a *Acidothiobacillus ferrooxidans*, como principal responsable de la biolixiviación bacteriana, puesto que puede oxidar ión ferroso a férrico, actúa como un agente oxidante muy eficaz para disolver sulfuros, siendo éstos quimiolitautótrofos, es decir, utilizan CO₂ como fuente de carbono y iones ferroso y compuestos sulfurados reducidos como fuente de energía. Además, utiliza el oxígeno como aceptor final de electrones.⁵ El uso de estos microorganismos en procesos tecnológicos es recomendable debido a sus simples requerimientos nutricionales y su alta adaptabilidad.⁶

Actualmente debido al agotamiento de los depósitos superficiales de oro, se hace necesario buscar alternativas viables para el aprovechamiento de los minerales que se encuentran a profundidades mayores.⁷ En este sentido, biooxidación es una de las tecnologías limpias con mayores posibilidades de aplicación en estos casos.⁸

El uso de éstas nuevas tecnologías se deben a la deficiencia que existe para la recuperación de metales por las tecnologías tradicionales para la recuperación de metales como el oro, a partir de minerales sulfurados, lo que hace que gran parte de este metal permanezca en los residuos sólidos, sin recuperar, siendo éstos una fuente potencial de obtención de este recurso. En este sentido, la biooxidación ofrece la posibilidad de solucionar en gran parte la problemática ambiental generada por la disposición de estos relaves que son ubicados en las riveras de los ríos de las zonas mineras del país.³ Por lo tanto, para el tratamiento biohidrometalúrgico de los minerales sulfurados conteniendo oro del sector sur del Ecuador, son fundamentales estudios sobre la optimización de las condiciones del proceso biooxidación.

2.3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.3.1. BIOOXIDACIÓN DE MINERALES

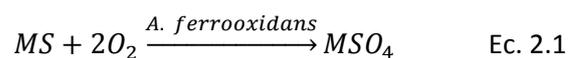
La biooxidación es la utilización de fenómenos biológicos y químicos que ocurren naturalmente para oxidar minerales sulfurados, mediados por bacterias. Estos procesos ocurren lentamente en la naturaleza y las condiciones para la biooxidación son raramente óptimas: temperatura, pH, humedad, disponibilidad de oxígeno, requerimiento de nutrientes, remoción de los productos finales de la reacción. Los procesos diseñados están dirigidos a proveer condiciones óptimas para la biooxidación y sobreponerse a los factores limitantes encontrados en el ambiente natural.

2.3.2. MECANISMOS DE BIOOXIDACIÓN

La condición de *A. ferrooxidans* ser quimioautótrofa le confiere una especial utilidad en los procesos conocidos como biolixiviación de minerales. Los metales se solubilizan al oxidarse el sulfuro metálico a sulfato. Las micropartículas de oro se encuentran encapsuladas por los sulfuros minerales y la oxidación de estos permite que el oro quede más expuesto al tratamiento final de recuperación por el método de Cianuración. En estos procesos se han propuesto dos formas de participación de la bacteria; el mecanismo directo y el mecanismo indirecto.⁹

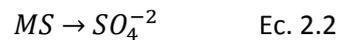
2.3.2.1. MECANISMO DIRECTO

El sulfuro metálico es oxidado a sulfato metálico por acción bacteriana de la siguiente manera expresado en la Ec. 2.1:



Siendo M un metal bivalente. Esto permite obtener sulfatos que son solubles en soluciones acuosas ácidas, lo que no sucede con los sulfuros de metales pesados.

En el método directo se necesita que la bacteria posea un contacto con la superficie de la partícula del mineral para que produzca la oxidación, es en esta superficie donde se lleva a cabo la disociación del sulfuro según la Ec. 2.2:

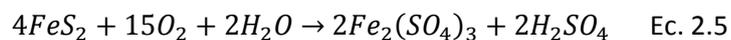


De esta forma el sulfuro ya está en solución, y podrá ser atrapado por el sistema enzimático bacteriano y oxidado a sulfato según la Ec. 2.3.

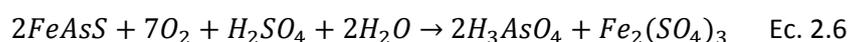


Teóricamente este proceso puede continuar hasta que todo el sustrato sea convertido en producto, pero en sistemas por lotes la acumulación de producto en niveles altos puede ocasionar una toxicidad al cultivo microbiano; Por otro lado, los precipitados cubren la superficie del sustrato impidiendo la acción bacteriana.

En la literatura sobre biooxidación de concentrados refractarios de oro, plantea las reacciones de oxidación bacteriana para pirita y arsenopirita, indicando la alta demanda de oxígeno. La descomposición de la pirita ocurriría de la siguiente manera según la Ec. 2.5:¹⁰

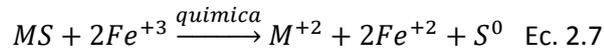


Y la biooxidación para la arsenopirita, como sigue en la Ec. 2.6:

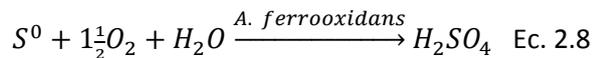


2.3.2.2. MECANISMO INDIRECTO

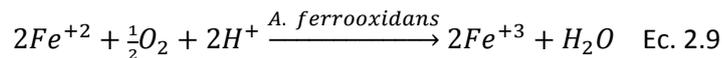
En este caso el sulfuro metálico es oxidado por el ión férrico, generado previamente por la oxidación bacteriana del ión ferroso¹¹ lo que se ve en la Ec. 2.7.



El azufre elemental puede ser oxidado a ácido sulfúrico por acción bacteriana, así como se ve en la Ec. 2.8.

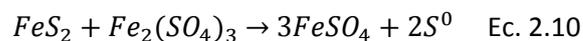


De la misma manera el ion ferroso es re-oxidado por la bacteria según la Ec. 2.9.

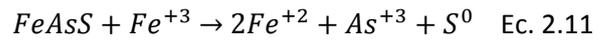


El mecanismo requiere la presencia de ion ferroso en solución para que pueda ser utilizado por la bacteria. La oxidación del ion ferroso puede realizarse sin la presencia bacteriana, pero se ha demostrado que ocurre a una velocidad mucho menor, siendo estimada que la acción del *A. ferrooxidans* aumenta la velocidad de oxidación del Fe^{+2} en 10^5 veces, a las condiciones de cultivo (pH<2; 30°C).¹²

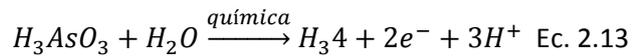
El rol del *A. ferrooxidans* en la oxidación de minerales sulfurados que contienen oro es probablemente indirecta, dependiendo de la especie mineral y determina la generación de un agente oxidante, el sulfato férrico y un solvente; el ácido sulfúrico, de acuerdo a las ecuaciones 2.8 y 2.9. El caso de la piritita es:



La probable reacción de arsenopiritita con el ion férrico que se observa en la Ec. 2.11 y 2.12.



Formándose compuestos muy inestables en el medio como ácido arsenioso, ion ferroso y azufre elemental, que son oxidados por acción química o bacteriana, se muestra en la Ec. 2.13:



El ion ferroso y azufre elemental son oxidados por la bacteria como se mostró en las ecuaciones 7 y 8. En presencia de ion férrico se forma arsenato de hierro como se muestra en la Ec. 2.14.



Los diferentes investigadores han demostrado que el mecanismo indirecto es que predomina ampliamente en el proceso. Aunque también se afirma que estarían participando ambos mecanismos, tanto el directo como el indirecto.

2.3.2.3. MECANISMO DE CONTACTO

En la actualidad el mecanismo de contacto es uno de los mecanismos q mejor puede explicar q sucede con las bacterias, la definición de este mecanismo supone la membrana bacteriana interacciona directamente con el sulfuro utilizando mecanismos enzimáticos. Esta no es la situación vista a través del estudio que se está refiriendo. Por otro lado, incluso en un mecanismo indirecto, puede ser muy complicado distinguir películas de dimensiones moleculares entre la célula bacteriana y el propio sulfuro. La bacteria se adhiere al sulfuro con el objeto de acondicionar las inmediaciones de éste de tal forma se facilite el proceso de disolución, que de otra manera no podría tener lugar.

Adicionalmente, se debe conocer como las bacterias se pueden adaptar a los distintos ambientes y sistemas de lixiviación. Algunos sulfuros se disuelven en una disolución ácida o pueden disolverse extrayéndoles electrones a través del aceptor final férrico. Está es una situación favorable para la lixiviación indirecta durante la cual la bacteria no tiene que estar adherida a la superficie del mineral.

Los sulfuros como la pirita no se pueden disolver fácilmente y es necesario recurrir a la lixiviación por contacto bien para romper la estructura cristalina del sulfuro y/o extraer azufre, o bien para disolverlo electroquímicamente con Fe^{+3} .¹³

2.3.3. CARACTERIZACIÓN DEL MINERAL DE PORTOVELO

De acuerdo a un estudio realizado en conjunto con la Universidad Complutense de Madrid y la UTP, en las cuales se han realizado técnicas de análisis como (FRX, DRX y MEB-EDX) han permitido caracterizar tanto química como mineralógicamente las arenas de relave del distrito minero Portovelo dando como resultado: La identificación básicamente tres sulfuros minerales de hierro: pirita (FeS_2), pirrotina ($\text{Fe}_{(1-x)}\text{S}$) y arsenopirita (FeAsS), con posibles sustituciones de otros elementos (Pb, Zn). La cantidad de plata presente es de 22 ppm. Aunque no se ha podido medir el oro, cabe esperar que el contenido de este elemento en una y otra muestra siga esta misma tendencia. No se detecta partículas de oro liberadas, así como ninguna fase argentífera, mediante microscopía electrónica de barrido de electrones retrodispersados. Dado que no se han observado partículas de Au libres y sí fases sulfuradas, parece lógico pensar que ambas fases se encuentren asociadas. Si fuera así, todo apunta a que el oro se encuentra encapsulado en la matriz de estos sulfuros minerales.¹⁴

Asímismo se indica que el peso específico del mineral del distrito minero Portovelo es de $2,65 \text{ g/cm}^3$, el valor de pH a 35 % de sólidos es de 6,5, y según su estudio la caracterización del mineral es la siguiente:¹⁵

Tabla 2.1 Caracterización del mineral del distrito minero Portovelo

Minerales	Fórmula	Cantidad (%)
Pirita	FeS ₂	19,1
Calcopirita	CuFeS ₂	0,44
Esfalerita	(ZnFe)S	0,95
Galena	PbS	0,4
Arsenopirita	FeAsS	--
Ganga	--	79,11

Y el análisis químico de espectrofotometría de Absorción atómica de muestras de relave según se muestra en la tabla 2.2.¹⁵

Tabla 2.2 Análisis químico por DFX o RFX del mineral del distrito minero Portovelo

Muestra Portovelo (MR-002)		
	Elemento	Concentración (%)
1	O	43,68
2	Si	20,95
3	Fe	16,38
4	S	5,39
5	Al	5,25
6	Ca	3,98
7	Mg	2,39
8	K	0,74
9	As	0,34
10	Ti	0,29
11	Na	0,26

2.3.4. BACTERIAS INVOLUCRADAS EN BIOOXIDACIÓN (*ACIDITHIOBACILLUS FERROOXIDANS*)

El *Acidithiobacillus ferrooxidans*, denominado hasta hace poco como *Thiobacillus ferrooxidans*,¹⁶ es un bacilo gram negativo, quimiolitotrofo, no esporulante, que obtiene la energía para su metabolismo de la oxidación de compuestos inorgánicos

sulfurados y de la oxidación de hierro ferroso. Se ha reportado un diámetro comprendido entre 0,5 a 0,6 μm y un largo entre 1 a 2 μm ¹⁷

Es aerobio estricto, mesófilo, crece en ambientes fuertemente ácidos, incluso a pH menores que 2,5. Es motil, poseyendo al menos un flagelo polar. Es autotrófico, por lo que sintetiza el carbón orgánico a partir de dióxido de carbono por la vía de Calvin.

Llama la atención de un artículo de ciertos autores en el cual reportan la capacidad de *Acidithiobacillus ferrooxidans* para oxidar minerales sulfurados (pirita, calcopirita y pirrotita) en condiciones anaerobias en presencia de Fe^{+3} como único aceptor de electrones, lo cual lleva a la conclusión que esta bacteria no es, en rigor un aerobio estricto. *Acidithiobacillus ferrooxidans* obtienen su energía de la oxidación de compuestos inorgánicos, tales como Fe^{+2} , S^{-2} , S^0 , $\text{S}_2\text{O}_3^{-2}$.

Su única fuente de carbono proviene de la fijación del CO_2 disuelto en el medio ácido, utilizándolo en las síntesis de los diversos componentes celulares.¹⁸

2.3.5. PARÁMETROS IMPORTANTES EN EL PROCESO DE BIOOXIDACIÓN

Para desarrollar adecuadamente un proceso de biooxidación, hay que considerar, aparte de los microorganismos y el mineral, otros parámetros operacionales susceptibles de manejar y modificar según requerimientos del cultivo. Estos parámetros dependen, obviamente de la naturaleza de las bacterias y del mineral que se trate en el proceso.

2.3.5.1. TEMPERATURA

Dado que el *A. ferrooxidans* es un organismo, mesófilo, el rango de temperatura óptima para la lixiviación de sulfuros con este microorganismo está ubicado entre 20°C y 35°C

Determinaciones experimentales en el medio sintético 9K que relacionen el efecto de la temperatura y la oxidación del ion ferroso, permiten estimar el valor óptimo en el rango de 30°C a 35°C.^{16, 18}

2.3.5.2. PH Y EH

El pH óptimo de biooxidación con *A. ferrooxidans* se ubica entre 1,5 a 2 un rango que abarca varias décimas, a valores de pH mayores a 2 pueden ocurrir efectos colaterales, como la formación y precipitación de complejos de jarosita. El pH puede variar debido a las características del mineral, si es que éste posee componentes consumidores de ácido.

Un pH inferior a 1,50 no se recomienda debido al efecto de desaceleración sobre el metabolismo de los microorganismos.¹⁹

Así como el pH indica la concentración del ion H^+ , análogamente el Eh indica la actividad de los electrones en el sistema. Esta actividad se manifiesta al haber, al menos un par de componentes de un sistema redox presentes en el cultivo. En las fermentaciones biooxidantes, el fenómeno principal en sí son justamente las reacciones que involucran movimientos de electrones, dados principalmente por la necesidad de los microorganismos involucrados de obtener su energía desde especies reducidas.

En síntesis, para que haya biooxidación deben haber reacciones redox en el sistema, ahora, tanto pH como Eh van a variar con el tiempo según las concentraciones de las especies presentes en el medio, y va a dar una idea de los equilibrios que van teniendo lugar en éste.¹⁷

El Eh podría tener efecto sobre el crecimiento celular. El uso de inóculos *A. ferrooxidans* adaptados a una corriente eléctrica de 1000 mal en un cultivo electrolítico presentó ventajas sobre inóculos no adaptados y no electrolíticos.¹⁰

2.3.5.3. CONCENTRACIÓN DE INÓCULO E INDUCTOR

La concentración de inóculo es la cantidad de bacterias en un volumen determinado que intervienen en un proceso de biooxidación, las cuales estando en un medio puro deben ser adaptadas en un medio mineral para que sean utilizadas en la inoculación en los procesos de oxidación biológica.

El sulfato ferroso heptahidratado va a ser el vehículo que contiene el inductor (Fe^{+2}) en el proceso de biooxidación, va a estar dado por la cantidad de esta sustancia en el ensayo, se relaciona con el mecanismo indirecto, donde actúa como un factor que interviene en éste proceso, ayudando a la reacción de ión ferroso a ión férrico, dándose así la biooxidación como tal.

La transformación energética asociada al proceso oxidativo de ion ferroso puede ser resumida en dos procesos relacionados: El transporte directo de electrones desde el ión ferroso al oxígeno, que mediante un mecanismo de quimiósmosis produce ATP; y un mecanismo reverso de transporte de electrones que utilizando una parte de la energía disponible en el transporte directo.¹⁰

Acidithiobacillus ferrooxidans tiene la potencialidad de reducir ion férrico mientras realiza la oxidación de azufre elemental. La reducción es medible solamente en condiciones anaeróbicas de acuerdo con estos autores.⁶ En contraste, se sugiere que esta bacteria es capaz de reducir ion férrico en la oxidación de azufre aún en presencia de aire.²⁰

En condiciones normales, el ion ferroso generado en la reducción es rápidamente oxidado haciendo imposible su detección, pero al aumentar la acidez (pH menor que 1,2) se produce la inhibición del proceso oxidativo de ion ferroso, observándose la reducción de férrico. Este proceso inhibitorio es reversible siendo el tiempo de respuesta del cultivo bacteriano relativamente corto. Es decir, bacterias que al ser expuestas a valores de pH menores que 1,2 han dejado de oxidar ion ferroso, reinician la actividad oxidativa de ion ferroso al volver a mayores valores de pH (1,8).¹⁰

Siempre un pH apropiado que se elija, la presencia de hierro férrico en la etapa inicial de lixiviación tiene una gran impacto en la tasa de lixiviación.¹⁹

El ión férrico, que corresponde al producto de la oxidación de ion ferroso por *Acidithiobacillus ferrooxidans* en soluciones ácidas aireadas, ha sido reportado como inhibidor competitivo por diversos autores. Lizama y

Suzuki (1989) estudiaron el consumo de oxígeno en la oxidación de sulfato ferroso adicionando distintas cantidades de sulfato férrico y bacterias, encontrando que la acción del ion férrico se correlaciona adecuadamente a un modelo de inhibición competitiva.

Adicionalmente encontraron que el efecto inhibitorio del ion férrico es sinérgico con la concentración de bacterias en solución, es decir, la inhibición férrica es más importante cuando la concentración bacteriana es mayor.²¹

2.3.5.4. NUTRIENTES

Los *A. ferrooxidans* son autótrofos y por tanto no requieren nutrientes orgánicos. Su fuente de energía es el Fe^{+2} , azufre o sulfuros de metales. Su fuente de carbono es el CO_2 , aunque también se ha demostrado que son capaces de utilizar glucosa. Los requerimientos de los otros nutrientes deben estar en el medio de cultivo en cantidades proporcionales a su composición celular, entre los más importantes se cuenta el nitrógeno (como sulfato de amonio), fósforo (como fosfato ácido de potasio), magnesio (sulfato de magnesio), calcio (nitrato de calcio), potasio (cloruro de potasio) y factores de crecimiento.

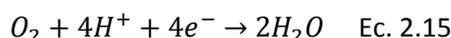
El medio 9K es el más utilizado en experimentación, siendo el nutriente limitante el sulfato ferroso.

La oxidación del ion ferroso muestra inhibición por presencia de cloruro, fosfato y nitrato a concentraciones menores que 0,1 M, también es inhibida por presencia de azida y cianuro.⁹

2.3.5.5. OXÍGENO Y DIÓXIDO DE CARBONO

El crecimiento de *A. ferrooxidans*, bacteria aerobia estricta, puede verse afectado por la concentración de oxígeno. En un medio ácido a solubilización del oxígeno y dióxido de carbono es muy baja requiere una velocidad máxima de transferencia de masa para O_2 y CO_2 para mantener el crecimiento bacteriano.

Para el caso del O_2 , este actúa como aceptor final de electrones en las reacciones de generación de energía del metabolismo de las bacterias biooxidantes. Como se observa en la Ec. 2.15.



En cuanto al CO_2 , este nutriente es la fuente de carbono utilizada por microorganismos autótrofos biooxidantes, lo fijan a través del Ciclo de Calvin.

La transferencia tanto de O_2 como de CO_2 se la realiza en la práctica mediante agitación mecánica o neumática.

2.3.5.6. TAMAÑO DE PARTÍCULA Y DENSIDAD DE PULPA

El tamaño de partícula es un parámetro crítico que influye en la velocidad del proceso y los costos asociados a la reducción del tamaño. Está asociado con el área superficial del mineral expuesta para ser atacada, así como el número de sitios activos disponibles. Esto último es de gran importancia, ya que las bacterias, al no tener sustratos solubles, necesitan adherirse a sólidos en busca de su fuente de energía, por lo que una gran población bacteriana necesitará mayores lugares donde encontrarla. Sin embargo, el tamaño de la partícula del mineral tampoco debe ser excesivamente pequeño, lo cual es imprescindible en sitios donde no hay agitación ni suspensión del mineral. Para los ensayos de biooxidación del distrito minero Portovelo se debe utilizar un tamaño de malla de 180-200, a una densidad de pulpa del 15% p/v que se indicará más adelante.⁵

La densidad de pulpa relaciona la cantidad de sólidos por unidad de volumen del medio de fermentación. Una mayor densidad de pulpa implicará una mayor masa disponible para ser biooxidada, y, por tanto, mayor cantidad de área superficial para que las bacterias se unan a ella. Sin embargo, hay que

diferenciar entre el aumento de área superficial por disminución de tamaño de las partículas y por aumento de densidad de pulpa.

En bibliografía se muestra que algunos minerales con bajo contenido de azufre/sulfuro presentan velocidades de solubilización óptimas a elevadas concentraciones de sólido. Un análisis detallado de los resultados muestra que probablemente la limitación de los procesos de biooxidación a altas concentraciones de sólidos podría estar relacionada con el contenido de azufre/sulfuro en el mineral y no solamente con el porcentaje de sólidos totales.²² La densidad de pulpa más conveniente para la biooxidación para el distrito Portovelo es del 15 % p/v.³

2.3.6. ASPECTOS CINÉTICOS.

El análisis cinético del proceso de biooxidación de un mineral concentrado de oro es un fenómeno complejo que involucra la adherencia de las bacterias al mineral, el crecimiento en el sólido y en el líquido.

2.3.6.1. ADHERENCIA DE LAS CÉLULAS AL MINERAL

En el análisis de adherencia de las bacterias al mineral es posible distinguir dos aspectos: principalmente el aspecto cinético que dice sobre la velocidad a la que se adhieren las células a mineral y de ningún otro modo sería la etapa limitante de la velocidad global pues es un proceso muy rápido (aproximadamente a los 30 minutos de estar en contacto con el mineral se ha establecido el equilibrio). El segundo aspecto y de mayor importancia, es la caracterización "termodinámica" de la adherencia, es decir en qué condiciones se establece el equilibrio. Se plantea que esta adherencia de las bacterias al mineral ocurre de manera selectiva y está controlada no sólo por una interacción física (electrostática e hidrofóbica) sino que la bacteria reconoce los sitios en los que se encuentran los iones reducidos en el mineral y se adhiere selectivamente a ellos, es decir existen sitios activos de un alto contenido energético los cuales son "preferidos" por las bacterias.²³

2.3.6.2. CRECIMIENTO EN EL LÍQUIDO

La velocidad de crecimiento en la fase líquida se relaciona con la concentración de iones Fe^{+2} en la solución. En muchos casos se planea la existencia de inhibición competitiva por partes de iones arsénico, de algunos metales pesados, de iones férrico incluso inhibición por sustrato es decir por iones ferroso.²⁴

2.3.6.3. CRECIMIENTO EN EL SÓLIDO

Generalmente se ha considerado el crecimiento en el sólido a expensas de sulfuro y de azufre elemental en forma simultánea. Probablemente esto constituye una buena aproximación si se tiene en cuenta la similitud en las vías metabólicas para la asimilación de ambos sustratos. La velocidad específica de crecimiento a expensas del sólido ha sido considerada como una constante que depende del microorganismo y del sustrato sólido utilizado por éste.²⁵

2.3.7. CIANURACIÓN

La cianuración es un proceso que se aplica al tratamiento de las menas de oro. Desde hace muchos años. Se basa en que el oro nativo, plata o distintas aleaciones entre estos, son solubles en soluciones cianuradas alcalinas diluidas, regidas por la Ec. 2.16:



Esta fórmula es conocida como la ecuación de ELSNER. Las principales variantes de lixiviación son: la lixiviación por agitación y la lixiviación por percolación.

Mediante la lixiviación por agitación, la mena molida a tamaños menores a las 150 mallas (aproximadamente tamaños menores a los 105 micrones), es agitada con solución cianurada por tiempos que van desde 6 hasta 72 horas. La concentración de la solución cianurada está en el rango de 200 a 800 ppm (partes por millón equivale a gr de cianuro por metro cubico de solución).

El pH debe ser alto, entre 10 y 11, para evitar la pérdida de cianuro por hidrólisis (generación de gas cianhídrico, CNH, altamente venenoso) y para neutralizar los componentes ácidos de la mena.

Para evitarlo anterior se usa cal, para mantener el pH alcalino. Se adiciona lo necesario para mantener la concentración de CaO libre en la solución por encima 100 g/m³.

- Las variables a determinar son las siguientes:
- Consumo de cianuro por tonelada de mineral tratado.
- Optimo grado de molienda.
- Tiempo de contacto, ya sea en la lixiviación por agitación como en la lixiviación por percolación.
- Concentración más conveniente del cianuro en la solución.
- Dilución más adecuada de la pulpa.²⁶

3. METODOLOGÍA

3.1. MICROORGANISMOS

Las bacterias *Acidithiobacillus Ferrooxidans* que se usó para esta investigación fue obtenido en el Centro de Biología Molecular y Celular de la UTPL, ésta cepa nativa proviene del aislamiento efectuado de drenajes ácidos de minas del distrito minero Portovelo en el año 2007.

3.2. MUESTREO Y PREPARACIÓN DE MUESTRAS

El mineral utilizado para los ensayos de biooxidación fue conseguido de los relaves de la zona minera de Portovelo. Se procedió a realizar la respectiva homogenización y cuarteo del mismo para luego someterlo a molienda en un molino de bolas escala de laboratorio de 1 HP de potencia (Figura 3.1 del Anexo 1) y luego a un análisis granulométrico en una serie de tamices A. S. T. M. determinado el D80 en un tamaño de malla de 184,8, éste se ve reflejado en el Anexo 2

Luego de cumplir con los parámetros establecidos de tamaño de partícula comprendida entre 180-200 mallas se realizó el lavado del mineral con una solución de etanol al 40%, además se lo esterilizó mediante la exposición de microondas en un aparato de microondas marca Panasonic durante 5 minutos.

La acidificación del mineral se la realizó en matraces Erlenmeyer de 500 ml en una solución final de 200 ml, con 30 g de mineral y 4ml de medio Norris 9K; se utilizó ácido sulfúrico concentrado logrando un pH de 1,8; midiendo continuamente con un pHmetro marca Hanna durante aproximadamente quince días con una agitación de 200 rpm en un agitador orbital de matraces marca Max3000 en una cámara termostatzada instalada en el laboratorio.

3.3. ADAPTACIÓN DEL INÓCULO EN MEDIO MINERAL

Se realizó la inoculación en un matraz Erlenmeyer de 1000 ml, a un volumen final de 500 ml, con 2% de mineral, 10ml de medio Norris 9K, 2% de inductor (Fe^{+2}) en una cámara termostatzada a 30°C instalada en el laboratorio, a una velocidad de agitación de 250 rpm en un agitador orbital marca MAXQ 3000 evaluando el pH continuamente hasta que se estabilizó en 1,8 aproximadamente en 15 días. Este procedimiento se realizó en el mismo lapso que la preparación y acidificación de las muestras a evaluar.

3.4. ENSAYOS DE BIOLIXIVIACIÓN

Posterior los ensayos sometidos a acidificación se procedió a colocar el inductor (Fe^{+2}) sulfato ferroso heptahidratado $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ y se controló el pH hasta que se estabilice en 1,8. Ver en la figura 3.2 en el Anexo 1

Una vez con las muestras acidificadas y el inóculo adaptado a medio mineral se procedió a hacer la inoculación en cada matraz Erlenmeyer, teniendo en cuenta las condiciones de cultivo tales como 30°C en una cámara termostatzada, agitación de 220 rpm en agitador orbital para matraces marca Max3000, así mismo tomar en cuenta que previamente ya se colocó el mineral al 15% de densidad de pulpa (30g) y el 2% de medio Norris 9K (4ml); éste último se describe su composición a continuación:

Tabla 3.1 Composición del medio 9K

Compuesto	Concentración (g/L)
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0,4
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,5
K_2HPO_4	0,2
KCl	0,1
H_2SO_4	Aprox. 1ml/L

Los parámetros tomados en cuenta para la validación de los ensayos de biooxidación son los siguientes: pH, potencial redox (EH), número de bacterias, determinación de Fe^{+2} , Fe Total, Fe^{+3} , determinación de sulfatos y determinación de productividades máximas. Ver los ensayos en la Figura 3.2 del Anexo 1.

3.4.1. DETERMINACIÓN DE pH Y Eh

Se realizó la medida del pH y Eh con un pHmetro marca Hanna periódicamente cada 7 días.

3.4.2. DETERMINACIÓN DEL NÚMERO DE BACTERIAS

Se realizó el conteo de células en una cámara de Neubauer tomando $10\mu\text{L}$ de muestra y colocada entre la cámara y la placa de cobre-objeto, luego se lo observó en el microscopio y se procede a hacer el conteo tal como se indica en la figura 3.3

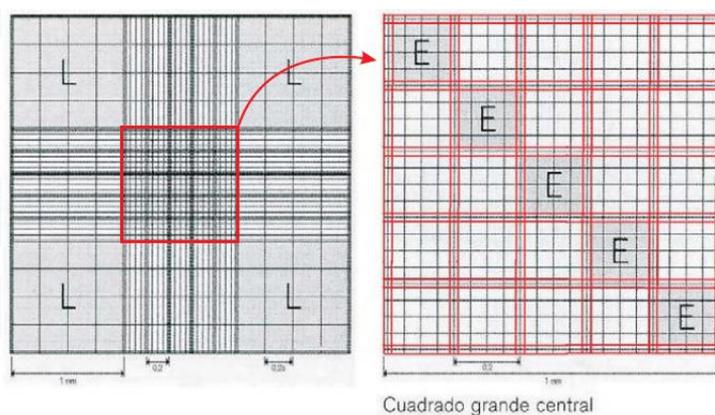


Figura 3.3 Cámara Neubauer Improved. Fuente: S.L., G. S. A., Cámara de Neubauer. http://shop.gabsystem.com/data/descargas/Camara%20thoma%20neubauer_Esp.pdf, Bcn [Spain] 2002. Vista: 2012-07-17

Además de eso se obtuvo el número de bacterias iniciales presentadas en la Tabla 3.2

Tabla 3.2 Número de bacterias iniciales

Concentración (%V/V)	Bacterias contadas	Bacterias /ml
5	55	11000000
10	63	12600000
15	70	14000000
20	68	13600000

Se determinó con la fórmula

$$bac/ml = \frac{\#bac.FD.10^6}{20} \text{ec. 3.1}$$

3.4.3. DETERMINACIÓN DE Fe^{+2} Y DE HIERRO TOTAL

El ion ferroso se determina utilizando el método de Muir, basado en la formación de un complejo coloreado entre Fe^{+2} y 1,10-fenantrolina y se compara con la curva de calibrado.²⁷ La curva de calibración y el procedimiento se la observa en el Anexo 4.

El hierro total se mide por reducción del Fe^{+3} con clorhidrato de hidroxilamina y midiendo el Fe^{+2} . El ion férrico se determina por diferencia entre ion ferroso y hierro total.²⁷ Ver en la figura 3.4 del Anexo 1, así como el procedimiento y curva de calibración en el anexo 4

3.4.4. DETERMINACIÓN DE SULFATO

El ion sulfato, en solución se determina por un método turbidimétrico. El ion sulfato es precipitado en un medio ácido con cloruro de bario formando cristales uniformes de sulfato de bario. La absorbancia de esta suspensión es una medida de la concentración de iones sulfato.²⁷ Ver el procedimiento y la curva de calibración en el Anexo 4.

3.4.5. DETERMINACIÓN DE LA PRODUCTIVIDAD VOLUMÉTRICA MÁXIMA

Se determina la velocidad de lixiviación con el método de la productividad volumétrica máxima a partir de las curvas de lixiviación de hierro y concentración de sulfato. El parámetro se determinó a partir del hierro total lixiviado o sulfato producido en función del tiempo.

3.5. ENSAYOS DE CIANURACIÓN

Fue preciso realizar la cianuración de las muestras biooxidadas para poder conocer por medio de un análisis de absorción atómica la concentración de oro recuperado.²⁸ Para lo cual fue necesario realizar un lavado de las muestras con agua destilada y someterlas a secado, con la finalidad de aumentar el pH de la muestra y evitar excesos en el consumo de cal durante la cianuración²⁹, se lo ha desarrollado de la siguiente manera indicado en el Anexo 5.

3.6. DISEÑO EXPERIMENTAL Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El diseño experimental planteado se llevó a cabo por bloques, experimentos donde (C) concentración de inóculo; (E) concentración de inductor, (CM) concentración de metal biooxidado. En todos los casos se consideró un patrón de control (B) sin bacterias y (R) corresponderá al número de repeticiones. En total se llevaron a cabo 28 ensayos para cumplir con los objetivos 1 y 2, indicados en la Tabla 3.3

Tabla 3.3 Diseño experimental

Objetivo	Preguntas de Investigación	Denominación	Variables	Condiciones	Valores Constantes	Variables Dependientes
1	¿Cuál sería la mejor concentración de inóculo del consorcio bacteriano Portovelo para la biooxidación de sulfuros polimetálicos?	C	Concentración de inóculo (%V/V)	5, 10, 15, 20	220 rpm 30°C 1,8 pH 15% densidad de pulpa Medio Norris	Fe ⁺² Fe total sulfatos EH pH

					Tamaño de partícula 74 µm	
2	¿Cuál sería la mejor concentración de inductor (Fe ⁺²) para la lixiviación de sulfuros polimetálicos?	E	Concentración de inductor(Fe ⁺² /gL ⁻¹)	2,4, 6, 8	220 rpm 30°C 1,8 pH 15% densidad de pulpa Medio Norris Tamaño de partícula 74 µm	Fe ⁺² Fe total sulfatos EH pH
3	¿Cuál sería la mejor recuperación de Oro del mineral biooxidado?	CM	Concentración de metal lixiviado en cianuración (ppm)	consumo de cal y cianuro	150 rpm 10,5 pH 24 horas Temperatura ambiente 33% dilución de pulpa	concentración de oro consumo de cianuro consumo de cal
Ensayos Totales						
(4C×3R+4B)+(3E×3r+4B)=29 experimentos						
(4C×3E×3R+4B)×CM=40 experimentos						

Por otro lado se llevó a cabo el análisis estadístico utilizando el programa de XLSTAT versión 7 Pro, en el que se realizaron pruebas comparativas de Duncan y Tukey, así mismo, se utilizó un análisis de regresión utilizando el método de mínimos cuadrados.

A continuación se muestra el diagrama de flujo del proceso en la figura 3.2

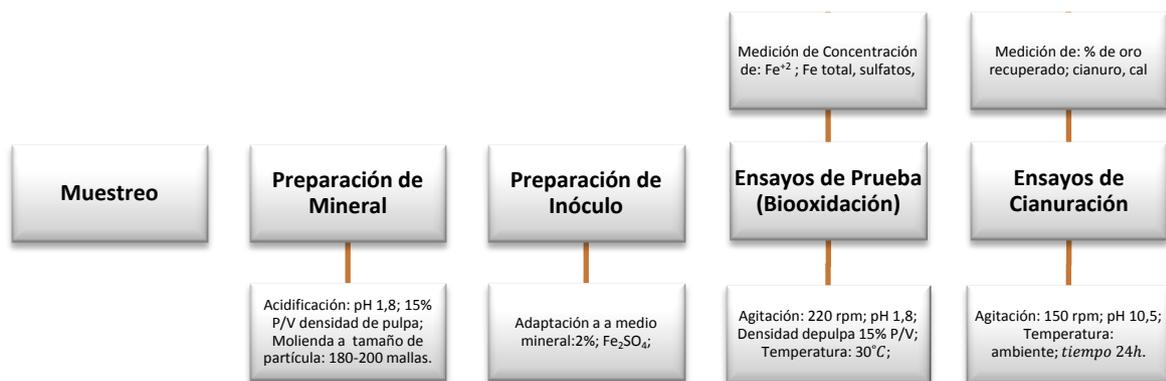


Figura 3.2 Diagrama de flujo de la metodología

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

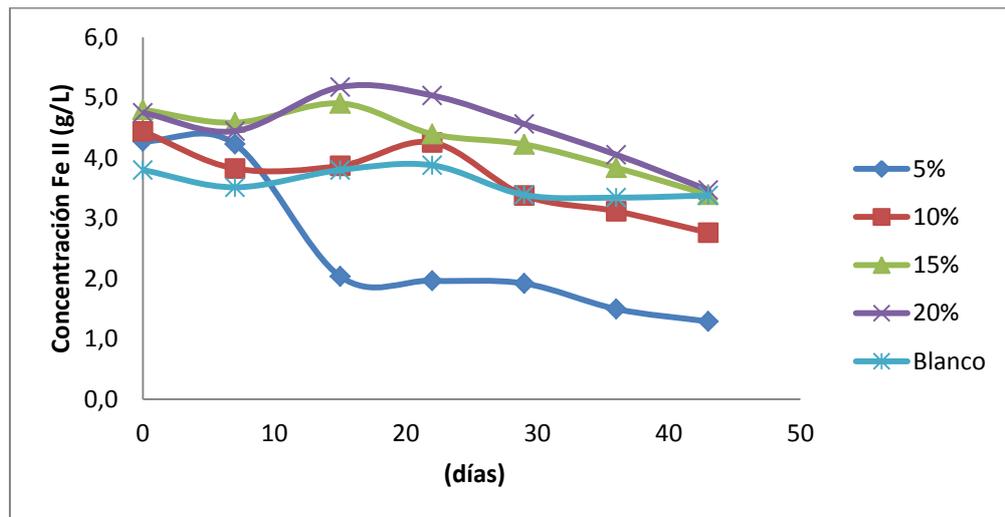
Se evaluó la mejor concentración de inóculo del consorcio bacteriano del Distrito Minero Portovelo en cuatro concentraciones 5%, 10%, 15%, 20% v/v respectivamente, una vez encontrado el mejor resultado se llevaron a cabo ensayos para obtener la mejor concentración de inductor (Fe^{+2}) 2%, 4%, 6%, 8% p/v, en el proceso de biooxidación.

Para el análisis estadístico se realizó un análisis de regresión múltiple a través de mínimos cuadrados para establecer el modelo que mejor se ajuste a los datos; así mismo se realizó un análisis comparativo de Duncan Y Tukey para optimizar la concentración de inóculo e inductor (Fe^{+2}), utilizando el programa XLSTAT en la versión Pro 7.5

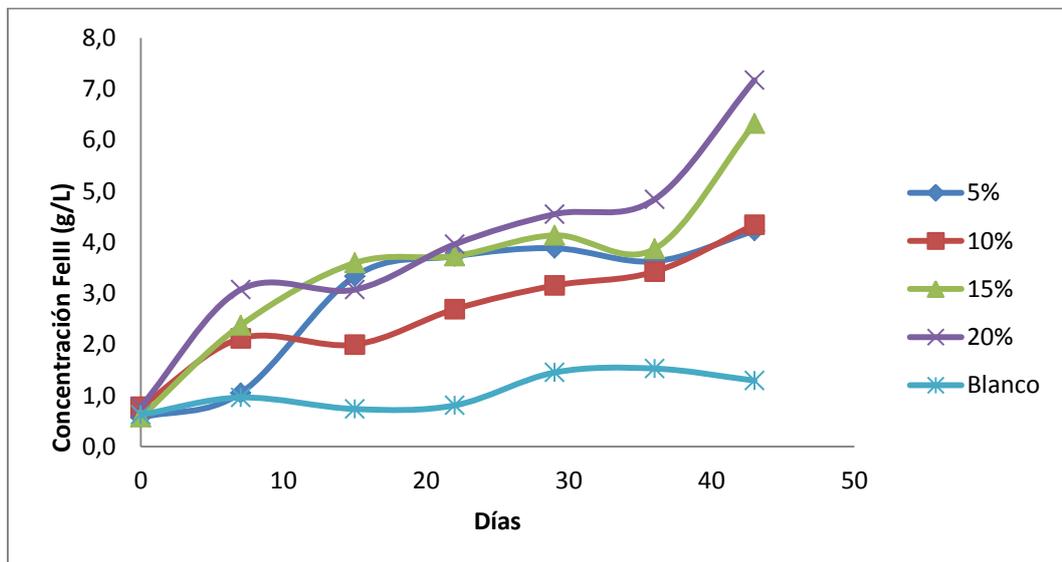
4.2. DETERMINACIÓN DE LA MEJOR CONCENTRACIÓN DE INÓCULO DEL CONSORCIO BACTERIANO PORTOVELO.

4.2.1. LIXIVIACIÓN DE HIERRO

La lixiviación del mineral por *A. ferroxidans* se realizó utilizando cuatro concentraciones de inóculo, la solubilización de hierro se muestra en la Gráfica 4.1 y 4.2



Gráfica 4.1 Concentración de Fe^{+2} durante la biooxidación variando concentración de inóculo.



Gráfica 4.2 Concentración de Fe^{+3} durante la biooxidación variando concentración de inóculo.

De acuerdo a la Gráfica 4.1, el proceso se caracteriza por mostrar un ligero aumento en la concentración de Fe^{+2} y luego una disminución de la velocidad de biolixiviación.

Además en esta gráfica se observa que los perfiles de oxidación son muy similares para las concentraciones de 10% a 20% excepto para la concentración de 5% de inóculo en donde el perfil de oxidación disminuye considerablemente.

En cuanto al perfil de concentración de Fe^{+3} mostrada en la Gráfica 4.2 se puede evidenciar que se tiene la mayor producción de Fe^{+3} se encuentran en la concentración de 20 % de inóculo, mientras que para la concentración de 5% a 15% el perfil de concentración de Fe^{+3} son similares.

Los perfiles de biooxidación presentados corresponden a reacciones auto-catalíticas en donde el aumento de la velocidad inicial se debe a un aumento de la población y consumo de nutrientes; luego existe una disminución de la velocidad debido a que empiezan a extraer la pirita en el mineral y puede llegar a los límites de tolerancia del metal por el microorganismo, alrededor de 20g/L se ha reportado que el ión férrico inhibe la oxidación de *A. ferroxidans*³⁰. En el caso de la concentración de 5% de inóculo, éste sale bajo debido a que el hierro mineral se ha consumido totalmente.

Análisis Comparativo de Tukey y Duncan

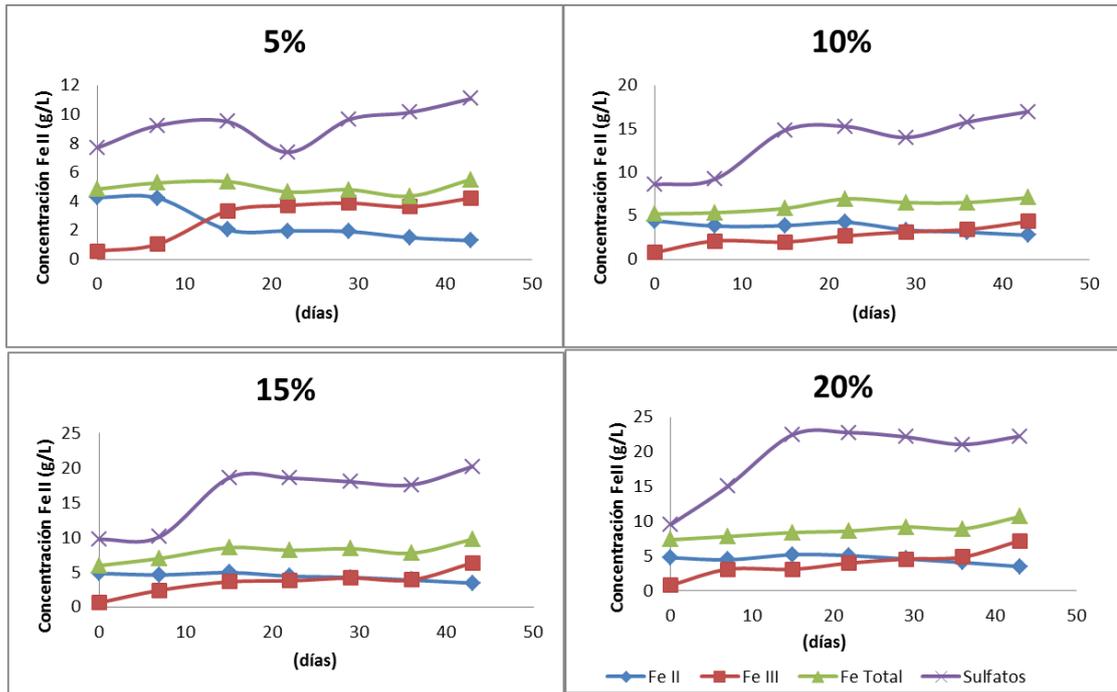
Es el análisis utilizando Tukey y Duncan para mostrar los grupos significativos que representa el ensayo lo que en la tabla 4.1 se muestra a continuación:

Tabla 4.1 Ordenación y agrupamientos de los grupos no significativamente diferente de Tukey

Categorías	Media	Agrupamientos
20	4,606	A
15	4,383	A
10	3,664	B
5	2,322	C

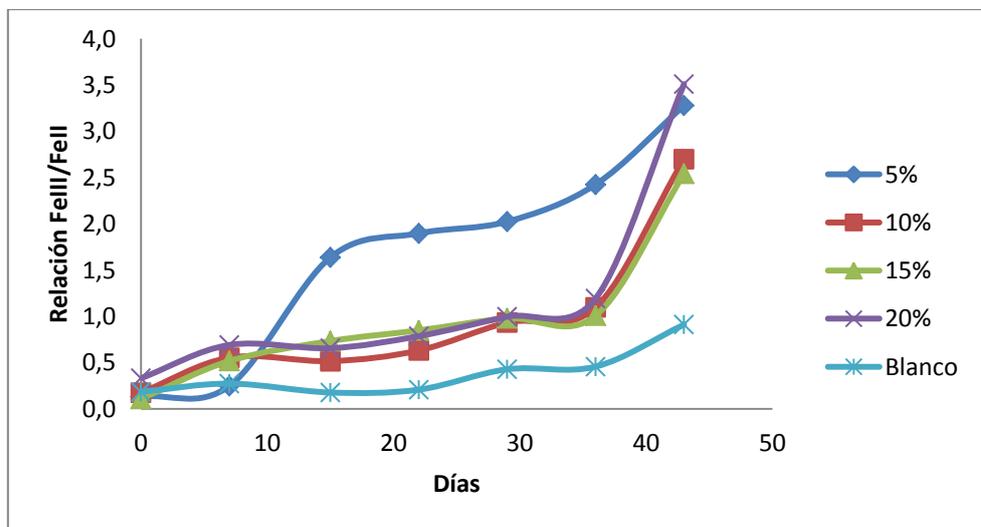
Este análisis comparativo de Duncan y Tukey muestra que existe una diferenciación significativa en cuanto a la biooxidación de hierro en función de la concentración de inóculo. La tabla 4.1 nos da una medida de la lixiviación férrica en donde se comprueba nuevamente que el inóculo de 20% y 15% representa una mayor capacidad de biolixiviación. El resto de datos se presentan en el Anexo 3

4.2.2. PERFIL DE OXIDACIÓN



Gráfica 4.3 Concentración de Fe^{+2} , Fe^{+3} , Fe Total y sulfatos durante la biooxidación en variación de la concentración de inóculo 5%, 10%, 15% y 20% V/V

En la Gráfica 4,3 se puede observar que la biooxidación se da con mayor facilidad en la concentración de inóculo del 5%, viéndose reflejado que en el día 15 se observa un cambio significativo en la concentración de hierro, mientras que para las concentraciones de inóculo de 10%, 15%, 20% la biooxidación se va realizando más paulatinamente.



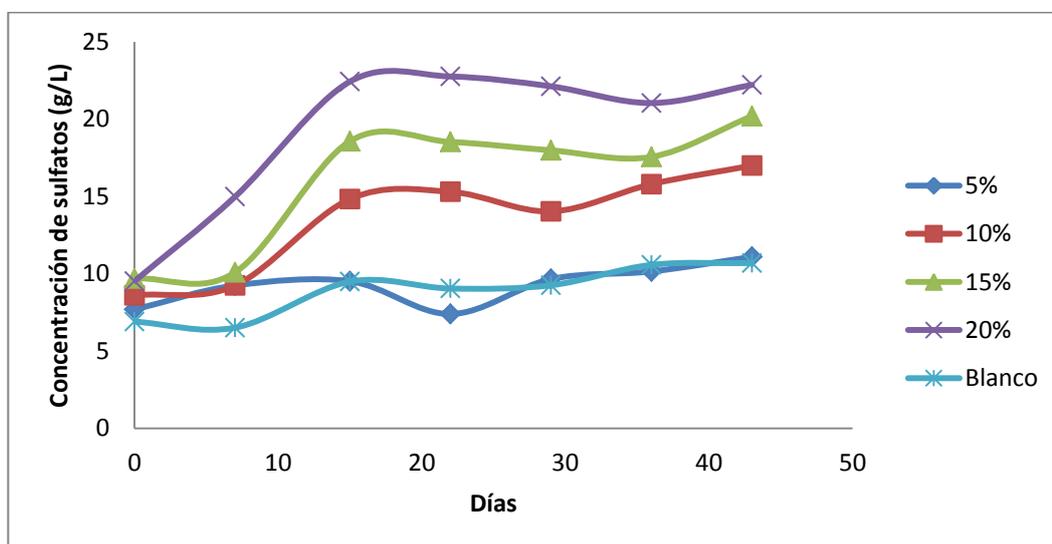
Gráfica 4.4 Razón Fe^{+3}/Fe^{+2} variando concentración de inóculo

La Gráfica 4.4 se muestra la razón Fe^{+3} en función de Fe^{+2} en donde nos podemos dar cuenta que el perfil de la concentración de inóculo del 5% se da con mayor rapidez y con una mayor magnitud, no así el resto de concentraciones, las cuales en función del tiempo no poseen una elevada razón Fe^{+3}/Fe^{+2} que le proporciona al medio lixivante una alta capacidad oxidativa.

Podemos decir que la razón entre las especies ion férrico-ion ferroso depende de la capacidad oxidativa del sistema que predomina por la oxidación de ion ferroso frente a la oxidación mediante oxígeno disuelto, hecho que podemos asegurar comparándolo con la gráfica esto de acuerdo con otros autores⁴

El efecto del volumen del inóculo aumenta la velocidad de ion ferroso y por lo tanto muestra la capacidad de adaptabilidad del microorganismo al mineral; por otro lado el hecho de que exista un alto porcentaje de hierro precipitado en el volumen de inóculo de 5% es causado debido al lento desempeño del *A. ferrooxidans* que puede producir ácidos, los cuales pueden decrecer significativamente la precipitación de hierro.

4.2.3. LIXIVIACIÓN DE AZUFRE



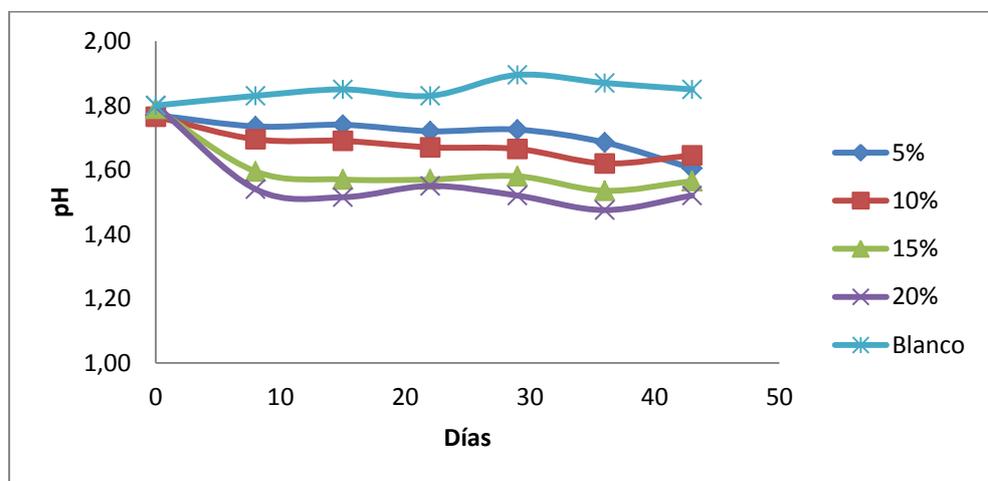
Gráfica 4.5 Concentración de sulfatos durante la biooxidación variando concentración de inóculo

En la Gráfica 4.5 al igual que la Gráfica 4.3 se observa la formación de sulfato durante la biolixiviación del mineral, en donde el perfil es el mismo que el de Fe^{+3} en solución. La formación de sulfato aumenta en función de la concentración de inóculo como se

puede ver en la figura anterior, en donde podemos evidenciar que la producción de sulfatos es directamente proporcional a la concentración de inóculo, y ésta se duplica en función de Fe^{+3} producido. De acuerdo a los experimentos realizados se puede decir que existe formación de sulfato como producto de la lixiviación férrica, el cual da la formación de ácido sulfúrico que además promueve una disminución de pH.

La pirita es lixiviada debido a una oxidación del azufre que constituye su estructura molecular, producto de esto se libera a la solución un átomo de hierro y especies oxidadas de azufre.³¹

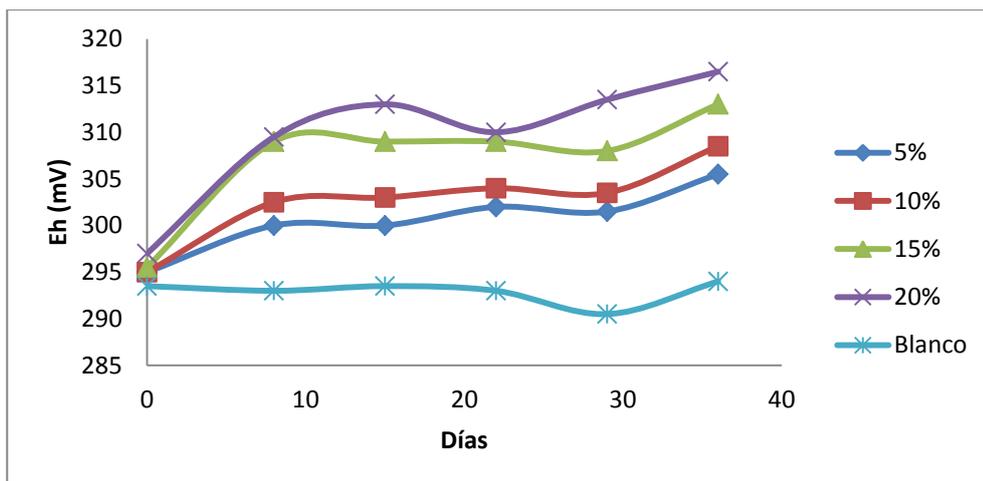
4.2.4. pH y EH



Gráfica 4.6 Variación de pH durante la biooxidación variando concentración de inóculo

En el proceso de biooxidación del mineral se midió el pH y el potencial REDOX el cual nos permite obtener una visión instantánea del estado oxidativo del medio lixiviado, en la Gráfica 4.6 se muestra la variación de pH durante la biooxidación, en donde partiendo en un pH inicial de 1,8 se llega hasta valores de 1,5 aproximadamente al 20% de concentración de inóculo, lo cual es debido a la producción de ácido sulfúrico durante la lixiviación del mineral.

Por otro lado la Gráfica 4.7 nos permite ver la variación del EH durante la biooxidación del mineral, este valor depende claramente de la concentración de inóculo, el cual alcanza valores máximos de 315 mV aproximadamente para la concentración de inóculo del 20%.



Gráfica 4.7 Variación de EH durante la biooxidación variando concentración de inóculo.

4.2.5. PRODUCTIVIDAD

La velocidad de lixiviación se determinó a partir de la productividad volumétrica máxima de hierro total y sulfato.

4.2.5.1. PRODUCTIVIDAD EN FUNCIÓN DEL HIERRO TOTAL Y SULFATOS

Tabla 4.1 Productividad de Hierro y sulfatos variando concentración de inóculo

Concentración de inóculo (X1)	Concentración de inductor (% w/vol) (X2)	Fe Qp (g/Ldia)	SO4 Qp (g/Ldia)
5	2	0,085	0,145
10	2	0,155	0,195
15	2	0,187	0,244
20	2	0,241	0,295
Blanco	2	0,057	0,088

Los datos de las tabla 4.1 corresponden a los resultados de la productividad volumétrica máxima de hierro y sulfato en función de la concentración de inóculo respecto a sus niveles máximos y mínimos.

Tabla 4.2 Coeficiente de regresión para las ecuaciones de productividad de hierro y sulfato variando concentración de inóculo

Coeficientes	Ec QP Hierro	Ec QP sulfatos
b0	0,172	0,219
b1	0,075	0,074
b2	-0,009	0,0006
R ²	0,999	0,999

Los resultados de la regresión múltiple se muestran en la tabla 4.2, en donde se encuentran los valores de los coeficientes de regresión para el modelo de productividad de hierro y sulfato.

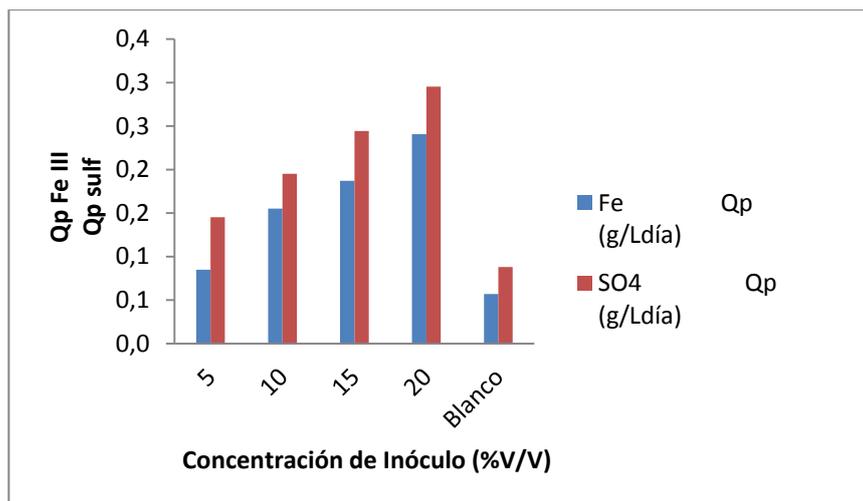
4.2.5.2. ANÁLISIS DE VARIANCIA PARA LA REGRESIÓN

El análisis de variancia para los datos de productividad se muestran en la Tabla 4.3 en donde el valor de F de la regresión es mayor al valor de F crítico con un 95% de confianza y un R^2 de 0,99 lo que significa que aproximadamente el 99% de la variabilidad de la productividad de hierro y sulfatos son explicados bajo el modelo de ecuación cuadrática.

El análisis de los coeficientes nos indica que el producto cuadrático es menos significativo que los coeficientes lineales, y el coeficiente de cero influye directamente sobre la productividad, tanto de sulfatos como de hierro; es decir, que el efecto de la concentración de inóculo presenta un efecto directo sobre la productividad de hierro y sulfato.

Tabla 4.3 Análisis de varianza para la productividad de hierro y sulfatos

	<i>Grados de libertad</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Valor crítico de F</i>
Regresión	1	0,012	0,012	361,206	0,003
Residuos	2	0,000	0,000		
Total	3	0,013			



Gráfica 4.8 Grado de extracción variando concentración de inóculo

En la Gráfica 4.8 se observa que la productividad volumétrica de hierro y sulfato aumenta en función de la concentración de inóculo de manera lineal para el hierro y el sulfato, con la diferencia que estequiométricamente el sulfato lo hace al doble del hierro.³²

Las ecuaciones del modelo están dadas de la siguiente manera por las ecuaciones 4.1 y 4.2:

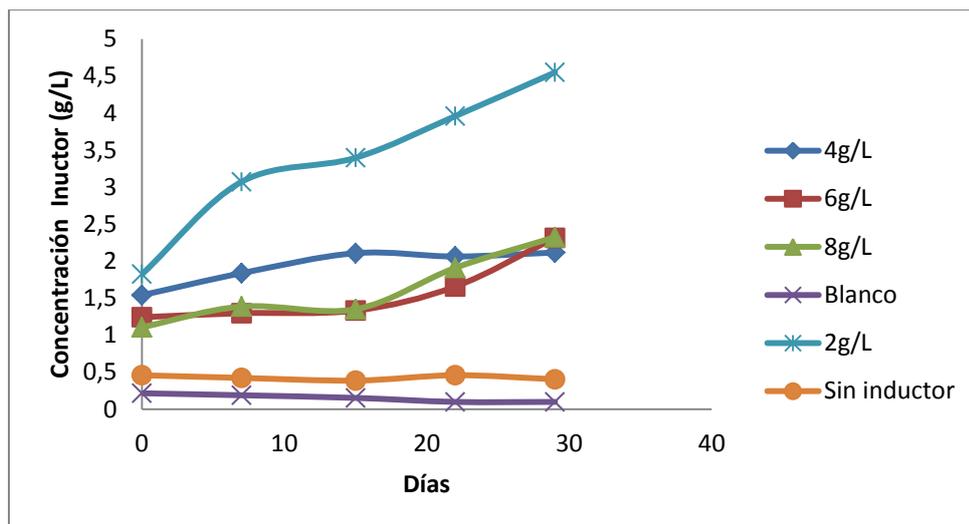
$$0,172 + 0,075x_1 - 0,009x_1^2 \quad \text{Ec. 4.1}$$

$$0,220 + 0,075x_1 - 0,001x_1^2 \quad \text{Ec. 4.2}$$

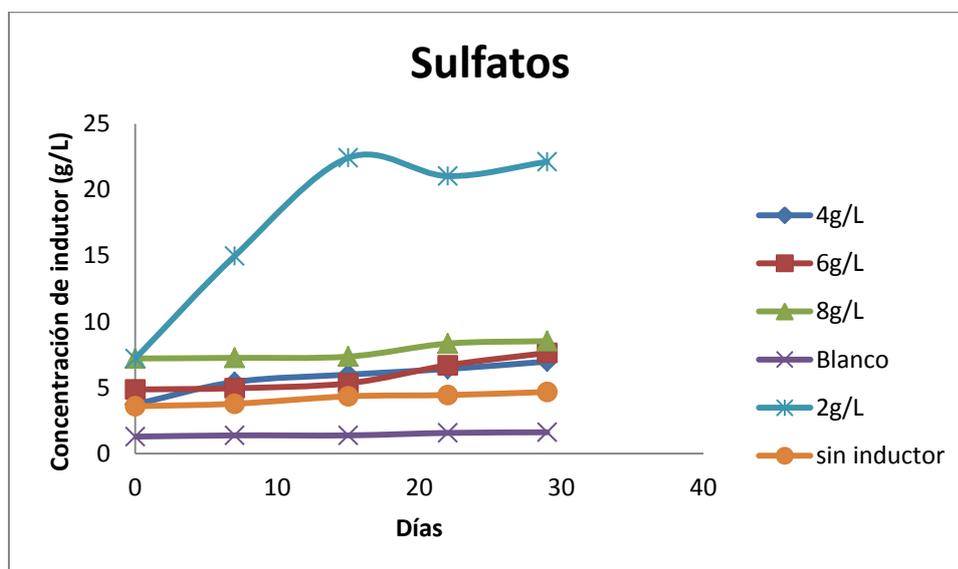
4.3. DETERMINACIÓN DE LA MEJOR CONCENTRACIÓN DE INDUCTOR (Fe^{+2}) DEL CONSORCIO BACTERIANO PORTOVELO.

4.3.1. LIXIVIACIÓN DE HIERRO Y SULFATO

La evaluación de los ensayos se realizó probando cuatro diferentes concentraciones de inductor (Fe^{+2}) 2,4, 6 y 8g/L de (Fe^{+2}), consecuentemente se incluyó dos controles el primero es un blanco el cual no posee inductor e inóculo y el segundo es un ensayo que solamente tiene inóculo, además se incluye la concentración de 2g/L testado en el objetivo anteriormente descrito.



Gráfica 4.9 Concentración de Fe^{+3} durante la biooxidación en variación de inductor (Fe^{+2})



Gráfica 4.10 Concentración de sulfatos durante la biooxidación en variación de inductor (Fe^{+2})

En la Gráfica 4.9 se aprecia que las concentraciones de inductor del 6g/L a 8g/L (Fe^{+2}) son similares entre sí, el perfil de la concentración de inductor de 2g/L tiende a ser mayor a las anteriores. Así mismo se puede observar que los controles evaluados tanto el blanco control como el ensayo con inóculo y sin inductor también de control, sus perfiles de oxidación son bajos respecto de las concentraciones mencionadas; en el primero se evidencia la poca o casi nula capacidad de oxidación del mineral, mientras que en el segundo se demuestra que a pesar de su capacidad de oxidar está no es significativa asegurándose que es preciso la utilización de un agente inductor para que pueda ser posible la biooxidación.

De igual forma en la Gráfica 4.10 se observa que los perfiles de producción de sulfatos, son similares a los de la gráfica 4.9 de oxidación de Fe^{+3} , que coincide con la relación estequiométrica $1Fe:2S$

Estudios similares demuestran que a la concentración de 2g/L existe un crecimiento confortable para los microorganismos y buena extracción de metal en mineral.⁴

Así mismo que a medida de que aumenta la extracción de Fe^{+2} se vuelve independiente la extracción del mineral, así como el crecimiento microbiano. Por otro lado en presencia de microorganismos sin fuente de energía no existe sustrato para que exista un crecimiento bacteriano y por lo tanto una oxidación de ion ferroso a férrico.¹⁹

Por otra parte los datos obtenidos coinciden con otros estudios donde se reporta un efecto de inhibición competitiva del ión ferroso en *A.ferrooxidans* por concentración de ion férrico y concentración celular creciente^{21, 33}

4.3.2. PRODUCTIVIDAD

4.3.2.1. PRODUCTIVIDAD EN FUNCIÓN DEL HIERRO TOTAL Y SULFATOS

Los datos de la Tabla 4.4 pertenecen a los resultados de la productividad volumétrica máxima de hierro y sulfato en función de la concentración de inductor (Fe^{+2}) respecto a sus niveles máximos y mínimos.

Tabla 4.4 Productividad máxima en variación de inductor (Fe^{+2})

Concentración de inóculo (X1)	Concentración de inductor (% w/vol) (X2)	Fe III Qp (g/L día)	SO4 Qp (g/L día)
20	2	0,241	0,295
20	4	0,020	0,112
20	6	0,037	0,096
20	8	0,042	0,045
Blanco	0	-0,004	0,011

Los resultados de la regresión múltiple se muestran en la tabla 4.5 en donde se encuentra el valor de cada uno de los coeficientes de regresión para el

modelo de productividad de hierro y sulfato en la variación de concentración inductor (Fe^{+2})

Tabla 4.5 Coeficiente de regresión para las ecuaciones de productividad de hierro y sulfato en variación de inductor (Fe^{+2})

Coeficientes	Ec. QP Hierro	sulfatos
b0	0,020	0,096
b1	-0,102	-0,033
b2	0,119	-0,017
R²	0,81	0,83

Los coeficientes de productividad obtenidos nos indican que los coeficientes individuales son significativos con un 95% de confiabilidad, por lo tanto, podemos decir que existe un efecto independiente mayor que el efecto lineal y cuadrático, en relación a elevadas concentraciones de ion ferroso.

4.3.2.2. ANÁLISIS DE VARIANCIA PARA LA REGRESIÓN

Tabla 4.6 Análisis de varianza para la productividad de hierro y sulfatos en variación de inductor (Fe^{+2})

	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico de F
Regresión	1	0,00024	0,00024	9,942	0,195
Residuos	1	0,00002	0,00002		
Total	2	0,00027			

El análisis de varianza para los datos de productividad se muestran en la Tabla 4.6 en donde el valor de F de la regresión es mayor al valor de F crítico con un 95% de confianza y un R^2 de 0,82 lo que significa que aproximadamente el 82% de la variabilidad de la productividad de hierro y sulfatos son expresados bajo el modelo de ecuación cuadrática.

La influencia de la concentración de inductor (Fe^{+2}) fue estudiada en diferentes concentraciones, a medida que el contenido de ion ferroso crece, la productividad de hierro y sulfato aumenta pero no de manera significativa como lo hace la concentración de 2g/L de inductor (Fe^{+2}), esto se debe a que

las concentraciones de 4, 6 y 8 g/L de inductor fueron muy elevadas donde su efecto inhibitorio fue notable.

Estudios similares demuestran que la velocidad de aparición de producto en el tiempo son mayores conforme aumenta la concentración de hierro, pero en las 20 horas de fermentación se empieza a notar el efecto inhibitorio del ion férrico que sería explicada por una inhibición competitiva por el ion férrico⁹

4.3.3. GRADO DE EXTRACCIÓN

El grado de extracción de hierro se modeló al igual que la productividad volumétrica (Qp) los resultados se muestran en la siguiente tabla utilizando los mismos niveles máximos y mínimos de los factores utilizados vistos en la Tabla 4.7

Tabla 4.7 Grado de extracción en variación de inductor (Fe+2)

Concentración inóculo (X1)	Concentración inductor	Hierro total de la muestra mineral	Concentración final de Hierro menos el inóculo en solución g/L	Hierro Extraído	Grado de extracción de hierro
	%	0,1638		%	
5	2	24,57	3,655	14,88	0,149
10	2	24,57	6,674	27,16	0,272
15	2	24,57	8,043	32,73	0,327
20	2	24,57	10,348	42,12	0,421

En la Tabla 4.8 se muestra los coeficientes de regresión múltiple basándonos en la ecuación cuadrática utilizada anteriormente en la productividad

Tabla 4.8 Coeficientes de productividad en variación de inductor (Fe+2)

Coeficiente	GE Hierro
b0	0,301
b1	0,131
b2	-0,016
R ²	0,99

En el grado de extracción de hierro el efecto que se da es lineal, lo que significa que para la concentración de inductor (Fe⁺²) está ajustado a un 95% de confianza y con un R² igual a 0,99 lo que significa que aproximadamente el 99% de la variabilidad del

grado de extracción de hierro es explicado por la ecuación 4.3 y como se muestra en la Tabla 4.8.

$$0,045 + 0,013x_1 - 0,006x_1^2 \text{ Ec. 4.3}$$

En consecuencia los resultados obtenidos nos indican que la concentración de inóculo causa un efecto mayor que la concentración de inductor sobre la biooxidación de minerales refractarios de oro. Obteniéndose un porcentaje de hierro extraído desde el mineral de 42,12%.

4.4. ENSAYOS DE CIANURACIÓN PARA RECUPERACIÓN DE ORO

En la tabla 4.9 se puede apreciar los gastos totales tanto de cal como de cianuro (CNNa) consumido durante el proceso de cianuración.

Tabla 4.9 Cianuración de las muestras

muestra	peso (g)	Cal total (g)	CN total(g)
B	29,11	0,55	0,30
2	30	1,09	0,29
4	29,22	4,38	0,30
6	29,59	4,74	0,29
8	30,22	4,01	0,29

Luego de la Cianuración de los ensayos biolixiviados se obtuvo como resultado después de la lectura por medio de absorción atómica que se presentan a continuación en la Tabla 4,10

Tabla 4,10 Rendimientos de recuperación de Oro

muestra	conc Au liq (mg/L)	conc. Au suel (mg/Kg)	Entrada (g)	Solución	Relave	rendimiento
B	0,31	0,74	0,11	0,03	0,02	25,90
2	0,845	1,6	0,11	0,08	0,05	67,64
4	0,47	0,96	0,11	0,04	0,03	38,95
6	0,49	1,07	0,11	0,04	0,03	39,68
8	0,50	1,08	0,11	0,04	0,03	39,57

Lo que la tabla refleja claramente que luego de biooxidar se puede recuperar hasta un 68% de oro, frente a un 25% que se lo podría hacer sin biooxidación. Por otro lado con las demás concentraciones se observa una recuperación de alrededor del 38%, lo que podemos asegurar que realmente la biooxidación es un método efectivo, favorable y lo más importante amigable con el medio ambiente.

Para realizar los cálculos de rendimiento de oro se lo realiza mediante la Ec. 4.4.

$$\% \text{Rendimiento} = \frac{S}{E} \times 100 \quad \text{Ec. 4.4}$$

De donde:

S= la concentración de oro en la solución en el proceso

E= la concentración de oro a la entrada del proceso

Ahora para calcular la concentración de oro tanto en la entrada como en la solución se determina como el producto entre la concentración de oro que resultó de la lectura del análisis de absorción atómica y el peso o volumen de muestra respectivamente.

5. CONCLUSIONES

- ✚ Luego de los ensayos de biooxidación se puede asegurar que la mejor concentración de inóculo que se obtuvo con los ensayos de biooxidación está dado por 15 % y 20% volumen/volumen. Pero el de 20% es el que mejor resulta, tanto por productividad como por grado de extracción.
- ✚ La concentración de inductor (Fe^{+2}) óptima que se logró encontrar luego de haber testado el proceso de biooxidación es de 2g/L. ya que si se aumenta la concentración de inductor (Fe^{+2}) se puede tener efectos de inhibición por producto en este caso ión ferrico.
- ✚ La productividad volumétrica máxima (Q_p) con los valores de concentración de inóculo e inductor de 20% y 2g/L respectivamente, tanto para hierro como sulfatos tuvo mejores resultados frente a los demás ensayos, con 0,241g/Ldía para hierro y 0,295g/Ldía para sulfatos.
- ✚ El mejor grado de extracción de hierro está dado por el 42%, lo que indica que este innovador proceso de recuperación de oro es favorable.
- ✚ Luego de realizar el proceso de cianuración a las muestras biooxidadas se obtiene aproximadamente un 68% de rendimiento de recuperación de oro.
- ✚ Después de la evaluación de los parámetros propuestos se puede señalar con certeza que la biooxidación es un proceso favorable para la recuperación de oro refractario con los relaves de la zona minera de Portovelo.

6. RECOMENDACIONES

- ✚ Para realizar ensayos de biooxidación es recomendable trabajar con 20% de concentración de inóculo V/V y 2g/L de concentración de inductor (Fe^{+2}), ya que con estas condiciones se favorece el desarrollo de este proceso novedoso.
- ✚ No utilizar concentraciones mayores a 2g/L de concentración de inductor (Fe^{+2}) porque existe inhibición de las bacterias, siendo no propicio para los objetivos enfocados de la biooxidación
- ✚ Se recomienda hacer una determinación de proteínas, parámetro por el cual se puede apreciar una mejor forma de como es el crecimiento de células plántónicas como de células adheridas al mineral.
- ✚ Se debería hacer investigaciones donde se compruebe como la biooxidación se comporta en un sistema continuo, evaluando con un mayor volumen, es decir de lo posible hacerlo en escala piloto.
- ✚ El proceso de biooxidación es un proceso recomendado para la recuperación de oro refractario y puede ser aplicado en el sector de Portovelo para mejorar la extracción de oro.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. NORRIS, P. R., Acidophilic Bacteria and their activity in mineral Sulfide Oxidation. Microbial Mineral recovery. *Associazione Mineraria Sarda* **1990**, 1, 3-23.
2. COLMER, A. R., HINKLE, M. E., The Role of Microorganisms in Acid Mine Drainage: A Preliminary Report. *Science* **1947**, 106, 253.
3. F. GORDILLO, J. P. S., V. SANMARTÍN, P. AGUIRRE, J.C. GENTINA, E. DONATI, Mineralogical characterization of a polymetallic concentrate Portovelo mining district. Bioleaching by a native bacterial consortium, *Advanced Materials Research. Scientific* **2009**, 71-73 481, 484.
4. MUQING QIU, G. W., WEIMINZHANG AND SHUIYING XIONG,, Optimizing conditions for bacterial leaching of copper from discarded mines. *Journal of University of Science and Technology Beijing* **2006**, 13, 108.
5. AGUIRRE P, Y. L., GENTINA J. C., Effect of density of pulp and size of particle on biooxidation of a polymetallic concentration in th southern sector of Ecuador. *UTPL* **2010**, 1-7.
6. BROK T, G. J., Ferric iron reduction by sulfur- and iron- oxidizing bacteria. *Environmental Microbiology* **1992**, 32 (32), 567-571.
7. FOO, K. A. a. B., M.D., New Gold processing techniques. *Gold Fórum technology and practices-Worl Gold 89 Edited by Bhappu and Harden. SME-AIME* **1989**, 233-250.
8. OLSON, G., Microbial oxidation of gold ores and bioleaching. *FEMS Microbiology* **1994**, 119, 1-6.
9. MUZZIO. Cinética de crecimiento de *Acidithiobacillus ferrooxidans* en un medio definido con sulfato ferroso como fuente de energía. . Universidad Católica de Valparaíso, Valparaíso, 2002.
10. MERRUANE, G. Oxidación bacteriana de sulfato ferroso con *Acidithiobacillus ferrooxidans*. Universidad de Chile, Santiago, 2002.

11. BRIERLEY, J., BRIERLEY, C, Microbial leaching of cooper at ambient and elevated temperatures. Metallurgical Application of Bacterial Leaching and Related Microbiological Phenomena. *Academic Press* **1978**.
12. LACEY, D., LAWSON, F. , Kinetics of liquid-phase oxidation of acid ferrous sulfate by the bacterium *Thiobacillus ferrooxidans*. *Biotechnol. Bioeng.* **1970**, 29-50.
13. BALLESTER, A., *Valparaiso Tecnologias Biomineras*. Publicaciones del Grupo ed.; Departameto de Ciencia de los Materiales e Ingeniería Metalúrgica Universidad Complutence: Madrid, 2001; p Capitulo 1.
14. CASAS, J. M., Caracterización Química y Mineralógica de arenas de relave. UCM, 2010.
15. GORDILLO, F., SANMARTIN, V., CARRION, F., Estudio de microorganismos nativos en proceso de biooxidación de minerales auríferos refractarios. *AIME* **2009**, *1*, 4-8.
16. KELLY, D. P. A. W., A. P. , Reclassification of some species of *Thiobacillus* to newly designated genera *Acidithiobacillus* gen. nov., *Haothiobacillus* gen. nov. and *Thermithiobacillus* gen. nov. **2000**, *50*, 511-516.
17. JENSEN, A. B., WEBB, D. P, Ferrous Sulphate Oxidation Using *Acidithiobacillus ferrooxidans*: a Review, *Process Biochemistry.* **1995**, *1*, 225-236.
18. SILVER, M., Metabolic mechanism of iron-oxidizing thiobacilli. Metallurgical Application of Bacterial Leaching and Related Microbiological Phenomena. *Academic Press* **1978**.
19. PINA P.S., L. V. A., SILVA C.A., DAMAN D., FRENAY J., The effect of ferrous and ferric iron on sphalerite bioleaching with *Acidithiobacillus sp.* *Minerals Engineering* **2005**, 2-3.
20. SAND, W., Ferric iron reduction by *Thiobacillus ferrooxidans* at extremely low pH-values. *Biogeochemistry* **1989**, *7*, 195-201.
21. LIZAMA H., S. I., Synergistic competitive inhibition of ferrous iron oxidation by *Thiobacillus ferrooxidans* by increasing concentrations of ferric and cells. *Environmental Microbiology* **1989**, *55* (10), 2588-2591.

22. BAILEY, A. H., G. , Factors affecting bio-oxidation of sulfide minerals at high concentrations of solids. *Biotechnol. Bioeng.* **1993**, *42*, 1164-1174.
23. CRUNDWELL, F. K., Matematical Modelling and Optimization of bacterial leaching plants. *Biohydrometallurgical Processing* **1995**, *II*, 437-446.
24. GENTINA, J. C., ACEVEDO, F., RIVERA, R., RETAMAL, F., SCHAFFEL, G., Influence of organic agents on the Kinetic of Bacterial Leaching of cooper ores. *hydrometallurgy and Electrometallurgy of Cooper* **1987**, *3*, 107-118.
25. KONISHI, Y., KUBO, H., ASAlD, S., A Biochemical engineering approach to the bioleaching of pyrite in batch continous tank reactors. *Biohydrometallurgical Technologies* **1993**, *I*, 259-268.
26. LARA, F. Proceso de Cianuración. Subrproyecto asistencia técnica y capacitación para el desarrollo técnico de Amalar. . geco.mineroartesanal.com (accessed abril).
27. HERRERA L, R. P., AGILLON JC, FEHRMANN A., A new spectrophotometric method for the determination of ferrous iron in the presence of ferric iron. *Chem Technol Biotechnol* **1989**, *44*, 171-181.
28. Daniel, H., *Análisis químico cuantitativo*. España, 2007; Vol. 3.
29. SAC, E. M. Manual de Minería. (accessed 2012-06-08).
30. JONES C., K. D., Growth of *Thiobacillus ferrooxidans* on ferrous iron in chemostat culture: influence of products and substrate inhibition. *Journal Chem. Technol. Biochnol* **1983**, *33B*, 241-261.
31. VALENCIA, P. A. F., Are bioleaching rates determined by the available particle surface area concentration? *World J Microbiol Biotechnolog.* **2009**, *25*, 101-106.
32. LI, X. F. P., S. H., HAN, X. L., MEI, C., XIAO T. Y., Influence of operation parameters on flash smelting fumace based on CFD. *Univ. Sci. Technol. Beijing* **2004**, *2*, 115.
33. NEMATI N., W. C., A Kinetic Model for Biological oxidation of ferros iron by *Thiobacillus ferrooxidans*. *Biotechnol. Bioengineering* **1997**, *53*, 478-476.

8. ANEXOS

ANEXO 1 FOTOGRAFÍAS DE EQUIPOS Y DE PROCESOS



Figura 3.1 Molino de Bolas de laboratorio para molienda. **Fuente:** Autor



Figura 3.2 Ensayos de Biooxidación durante el proceso. **Fuente:** Autor

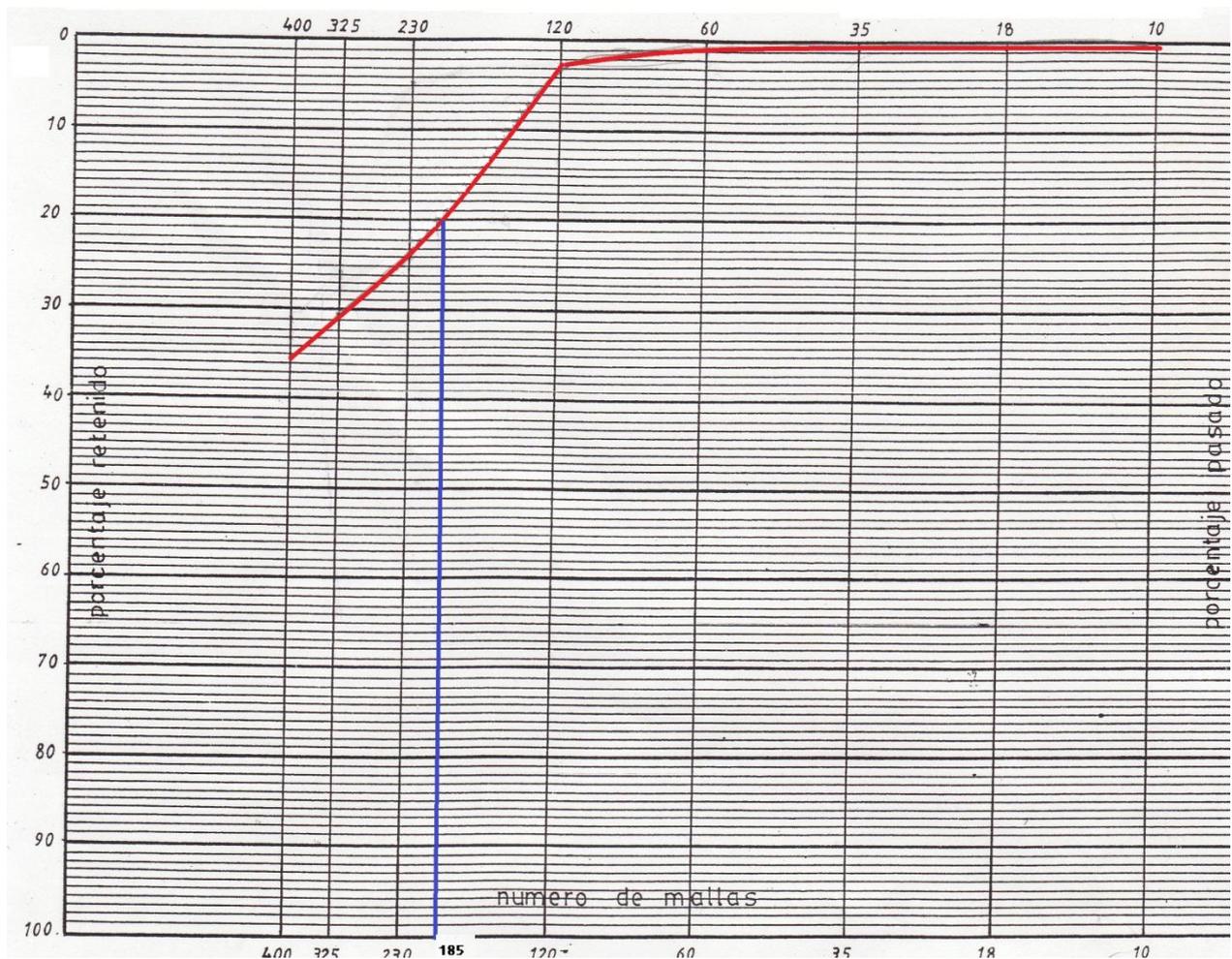


Figura 3.4 Espectrofotómetro ThermoScientific para la medición de Fe^{+2} , Fe Total, Sulfato. **Fuente:** Autor



Figura 3.5 Espectrómetro de Absorción Atómica. **Fuente:** Autor

ANEXO 2 ANÁLISIS DE GRANULOMETRÍA



abertura (μm)	Mallas(#)	Peso (g)	Peso (%)	Retenido acumulado (%)
2000	10	0,01	0,01	0,01
1000	18	0,03	0,02	0,02
500	35	0,03	0,02	0,04
250	60	0,03	0,02	0,06
125	120	4,13	2,30	2,36
63	230	38,37	21,40	23,76
45	325	11,31	6,31	30,07
37	400	9,52	5,31	35,37
	-400	0,87	0,49	35,86
	lomas	115,01	64,14	100,00
	suma	179,31	100,00	

ANEXO 3 ANÁLISIS DE VARIANZA

Tabla 8.1 Coeficientes de ajuste:

R (coeficiente de correlación)	0,947
R ² (coeficiente de determinación)	0,898
R ² aj. (coeficiente de determinación ajustado)	0,882
SCR	7,579

Tabla 8.2 Pruebas de comparaciones múltiples para la variable 5:

Tukey (HSD) / Análisis de las diferencias entre grupos con un intervalo de confianza de 95,00 %:

Categorías	Diferencia	Diferencia estandarizada	Valor crítico	Pr. > Dif	Significativo
20 ~ 5	2,284	14,766	2,663	< 0,0001	Sí
20 ~ 10	0,942	6,207	2,663	< 0,0001	Sí
20 ~ 15	0,223	1,471	2,663	0,463	No
15 ~ 5	2,061	13,323	2,663	< 0,0001	Sí
15 ~ 10	0,719	4,736	2,663	0,000	Sí
10 ~ 5	1,342	8,675	2,663	< 0,0001	Sí

Valor crítico del d de Tukey: 3,767

Tabla 8.3 Ordenación y agrupamientos de los grupos no significativamente diferentes:

Categorías	Media	Agrupamientos
20	4,606	A
15	4,383	A
10	3,664	B
5	2,322	C

Tabla 8.4 Prueba de Duncan / Análisis de las diferencias entre grupos con un intervalo de confianza de 95,00 %:

Categorías	Diferencia	Diferencia estandarizada	Valor crítico	Pr. > Dif	Alfa (modificado)	Significativo
20 ~ 5	2,284	14,766	2,184	< 0,0001	0,143	Sí
20 ~ 10	0,942	6,207	2,116	< 0,0001	0,098	Sí
20 ~ 15	0,223	1,471	2,012	0,148	0,050	No
15 ~ 5	2,061	13,323	2,116	< 0,0001	0,098	Sí
15 ~ 10	0,719	4,736	2,012	< 0,0001	0,050	Sí
10 ~ 5	1,342	8,675	2,012	< 0,0001	0,050	Sí

Pruebas de comparaciones múltiples para la variable 0*5:

Tabla 8.5 Tukey (HSD) / Análisis de las diferencias entre grupos con un intervalo de confianza de 95,00 %:

Categorías	Diferencia	Diferencia estandarizada	Valor crítico	Pr. > Dif	Significativo
0*5-10 ~ 0*5-5	0,140	3,710	2,663	0,003	Sí
0*5-10 ~ 0*5-15	0,005	0,504	2,663	0,958	No
0*5-10 ~ 0*5-20	0,003	0,237	2,663	0,995	No
0*5-20 ~ 0*5-5	0,137	3,644	2,663	0,004	Sí

0*5-20 ~ 0*5-15	0,003	0,268	2,663	0,993	No
0*5-15 ~ 0*5-5	0,134	3,569	2,663	0,005	Sí

Valor crítico del d de Tukey: 3,767

Tabla 8.6 Ordenación y agrupamientos de los grupos no significativamente diferentes:

Categorías	Media	Agrupamientos
0*5-10	0,037	A
0*5-20	0,034	A
0*5-15	0,032	A
0*5-5	-0,103	B

Tabla 8.7 Prueba de Duncan / Análisis de las diferencias entre grupos con un intervalo de confianza de 95,00 %:

Categorías	Diferencia	Diferencia estandarizada	Valor crítico	Pr. > Dif	Alfa (modificado)	Significativo
0*5-10 ~ 0*5-5	0,140	3,710	2,184	0,003	0,143	Sí
0*5-10 ~ 0*5-15	0,005	0,504	2,116	0,870	0,098	No
0*5-10 ~ 0*5-20	0,003	0,237				No
0*5-20 ~ 0*5-5	0,137	3,644	2,116	0,002	0,098	Sí
0*5-20 ~ 0*5-15	0,003	0,268	2,012	0,790	0,050	No
0*5-15 ~ 0*5-5	0,134	3,569	2,012	0,001	0,050	Sí

Tabla 8.8 Ordenación y agrupamientos de los grupos no significativamente diferentes:

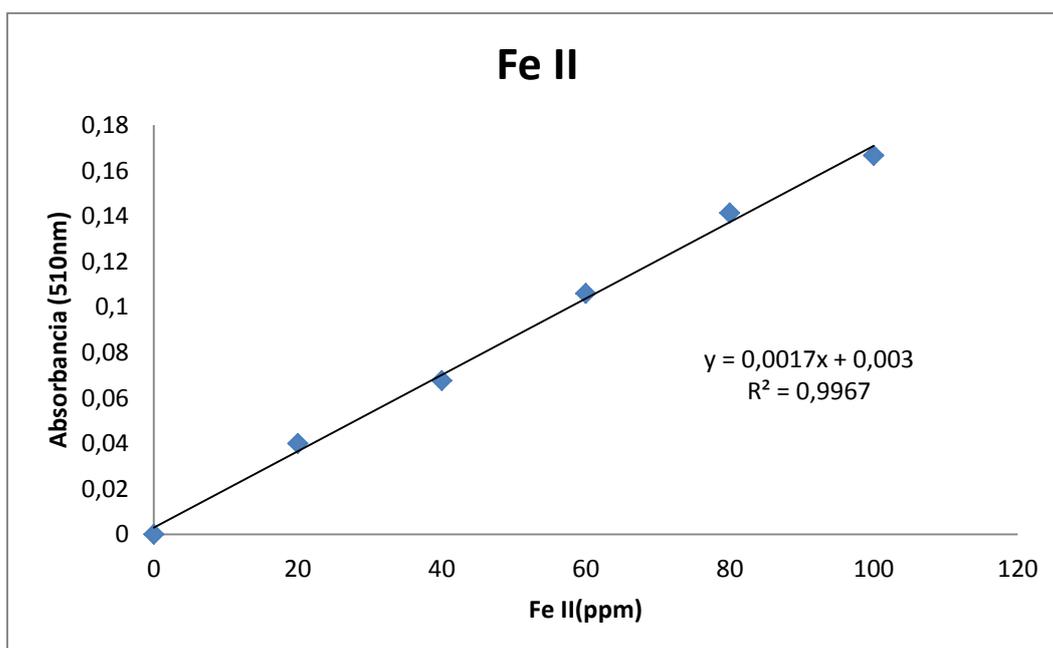
Categorías	Media	Agrupamientos
0*5-10	0,037	A
0*5-20	0,034	A
0*5-15	0,032	A
0*5-5	-0,103	B

ANEXO 4 CURVAS DE CALIBRACIÓN

Determinación de Fe^{+2}

El procedimiento que se siguió para la medición de fue el siguiente: tomó un muestra de la olución biolixiviada y se procedió a diluir con agua acidulada, luego se tomó una muestra de 0,1 ml en la que se adición 1 ml de complejante, se agitó por dos minutos y se le adicionó el reactivo 1,10 fenantrolina, nuevamente se procedió agitar y se diluyó la mezcla con agua acidulada. La absorbancia se midió por espectrofotometría de UV visible a 510 nm, en un espectrofotómetro marca Thermo. El blanco contuvo todos los reactivos con excepción de la muestra, el cual se reemplaza por agua acidulada.

Se realizó las curvas de calibración para Fe^{+2} con sulfato ferroso heptahidratado y midiendo las absorbancias tal y como se lo explicó en la metodología. Haciendo la lectura por tres repeticiones. La desviación estándar de la curva de calibración de Fe^{+2} es 0,062



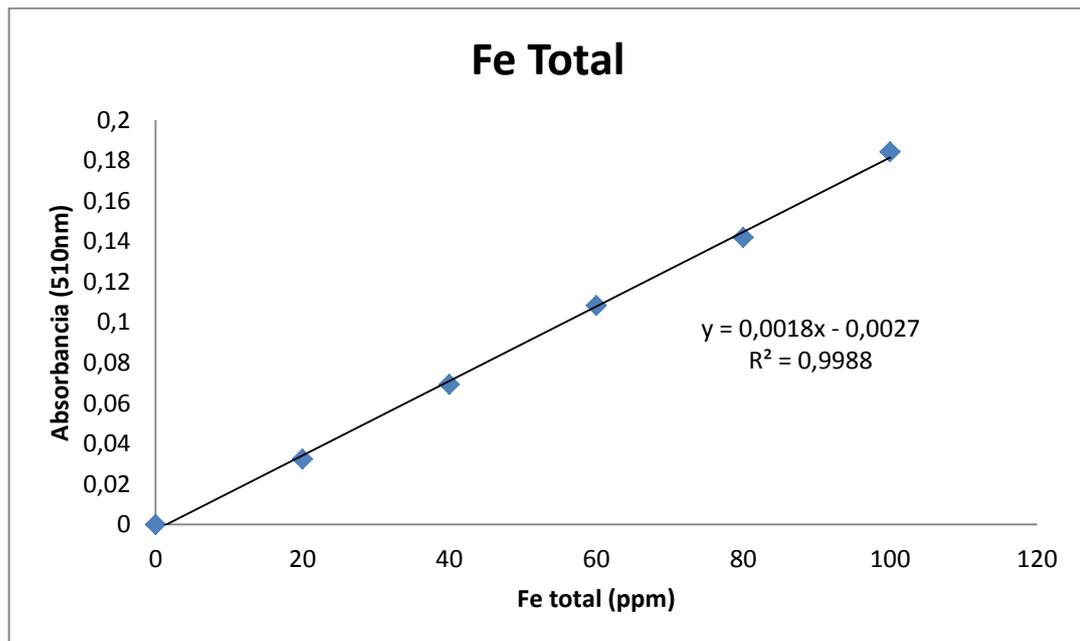
Grafica 8.1 Curva de calibración de Fe^{+2}

Determinación de Fe Total

El procedimiento es muy parecido a la lectura de Fe^{+2} , lo que varió es en la composición y los reactivos donde se tomó la muestra en un tubo de 10ml, se le adicionó hidroxilamina,

fenantrolina y aforado a 2,5ml de agua acidulada. Así mismo el blanco contuvo todos los reactivos con excepción de la muestra, el cual se reemplaza por agua acidulada. Además se realizó tres repeticiones de cada lectura.

Se realizó las curvas de calibración para Fe total con sulfato ferroso heptahidratado y midiendo las absorbancias tal y como se lo explicó en la metodología. Haciendo la lectura por tres repeticiones. La desviación estándar de la curva de calibración de Fe⁺² es 0,068

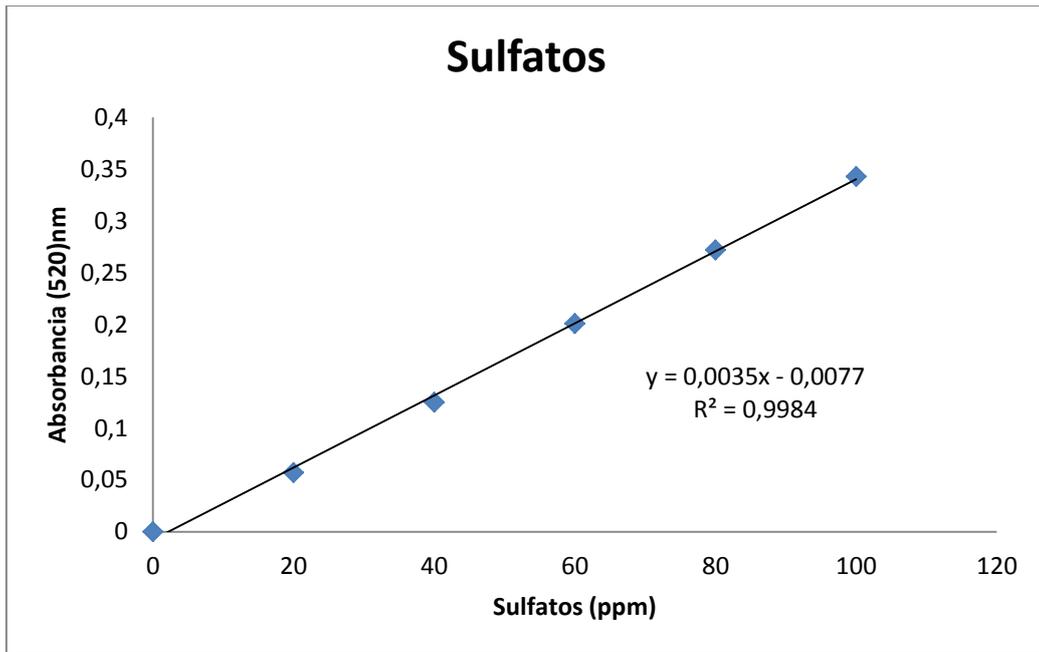


Gráfica 8.2 Curva de Calibración de Fe Total

Determinación de Sulfatos

El procedimiento que se realizó se describe a continuación, se tomó la muestra y diluyó con agua des-ionizada en un tubo de 10ml, se agregó con la punta de la espátula cloruro de bario y se agitó por un minuto, luego se leyó la absorbancia 520 nm así mismo en el espectrofotómetro. Se utilizó como blanco una muestra a la que no se le añade cloruro de bario.

En el caso de sulfatos se hizo analógicamente igual como indicado en la metodología y en las curvas de calibración de Fe. La desviación estándar fue de 0,130



Gráfica 8.3 Curva de calibración de sulfatos

ANEXO 5 PROCEDIMIENTO PARA CIANURACION

De las muestras de los ensayos de biooxidación, se pesó 30g y se hizo una dilución de pulpa con relación 1:2, se controló el pH, se añadió cal si es necesario hasta alcanzar un pH de 10.5. Así mismo se adicionó cianuro de sodio (NaCN) con una concentración de 1 g/L, manteniendo constante por 24 horas, controlando el gasto de cianuro periódicamente; para lo cual se filtró a vacío 5ml de pulpa, hasta obtener una solución clara. Posteriormente se colocó 5 gotas yoduro de potasio como de indicador. Se procedió a titular con una solución de nitrato de plata con una concentración de 4,94 g/L.

Cuando la solución se mostró con un color ligeramente amarillento fue cuantificado el volumen de nitrato de plata gastado, realizando los cálculos correspondientes para conocer la cantidad de cianuro consumido, y por lo tanto la cantidad de cianuro que se debió agregar para reponer el gasto del reactivo. Así mismo, se controló y repuso el volumen de agua antes extraído, manteniendo controlado el pH adicionando cal si era necesario para mantener el pH de 10.5, este mismo proceso se lo realiza cada determinado tiempo. Culminadas las 24h de cianuración, se filtró al vacío la pulpa y procediéndola a secarla en la estufa para disgregarla y someterla a análisis por espectrofotometría de absorción atómica tanto a la parte sólida como a la solución cianurada.

Luego de hacer la digestión de las muestras sólidas se leyó los diferentes ensayos las concentraciones de oro en el espectrómetro de absorción atómica marca Perkin Elmer. Dándonos resultados directos. En la figura 3.5 del Anexo 1 se observa el equipo de absorción atómica utilizado.

ANEXO 6 ARTÍCULO CIENTÍFICO

PARAMETERS OPTIMIZATION FOR THE BIO-OXIDATION OF POLYMETALLIC MINERALS OF THE PORTOVELO MINING DISTRICT

Esvar Díaz D.,^{1*} Paulina Aguirre Ch.²

¹Titulación de Ingeniería Química, Universidad Técnica Particular de Loja
San Cayetano Alto s/n, 1101 608, Loja, Ecuador.

²Departamento de Química, Universidad Técnica Particular de Loja
San Cayetano Alto s/n, 1101 608, Loja, Ecuador.

*Corresponding author: eddiaz@utpl.edu.ec

ABSTRACT

The deficient recovery of metals such as gold is generating social and an environmental issues in Ecuador, therefore the bio-oxidation of sulphuretted minerals offers a sustainable and economic alternative for its recovery. The bio-oxidation of gold minerals is a process in which the small gold particles inserted in the sulphuretted mineral matrix are accessible to cyaniding, making gold recovery possible, this process is carried out using microorganisms.

The objectives of this investigation were to determine the optimal values for bio-oxidation of inoculate and inducer (Fe^{+2}) concentrations for the leaching of polymetallic sulfides and to obtain the best gold recovery of the bioleached minerals through the cyaniding process. Native *Acidithiobacillus ferrooxidans* microorganisms were used. Laboratory tests were carried out at 5, 10, 15 and 20 % V/V of inoculum concentration and four inducer (Fe^{+2}) concentrations: 2, 4, 6 and 8 g/L. The initial temperature and pH were 30 °C and 1,8 respectively, the particle size of the concentrated mineral was 64 μm and pulp density of 15 % w/V. The determined parameters were: pH, Eh, bacteria number, and concentration measurement of: total iron, Fe^{+2} and sulphates; these last ones were obtained by means of colorimetrics methods.

The results obtained after bio-oxidation tests presented that the best inoculum concentration is 20 % V/V, also the best inducer (Fe^{+2}) concentration is 2 g/L, if both concentrations exceed these limits, an inhibition of the bacteria takes place, on the other hand The maximum productivity (Q_p), both iron and sulfate had better results than other tests, with 0.241 g/Ldia for iron and 0.295 g/Ldia to sulfates. The best degree of iron extraction is 42 %, which indicates that this innovating process of gold recovery is favorable.

Keywords: *bio-oxidation, inoculate, inducer, productivity*

INTRODUCTION

The application of biotechnology for various metal recovery using wastes generated by the mining process could have a great impact on

this industry; simultaneously new economic opportunities would be generated. Within the main benefits of the bacterial leaching are its low cost and its lower environmental impact

in comparison with the traditional mining and metallurgical processes.¹

In Ecuador, the deficient use of traditional technologies for gold recovery utilizing sulphuretted minerals, causes that great part of this metal remains in the solid wastes without recovering, being a potential source to obtain this resource, therefore, bioleaching offers the possibility to solve in a great extent the environmental issue generated by the disposition of these tailings in the border of the rivers.²

The inoculum concentration is the amount of bacteria that take part in a bio-oxidation process, these bacteria live in a pure medium which must be adapted in a mineral medium in order to be used in the inoculation of the biological oxidation processes. On the other hand, the inducer (Fe^{+2}) in the bio-oxidation process, is related to the indirect mechanism, where it acts as an important factor in this process, helping and being the initiator of the ferrous to ferric ion reaction, thus, the bio-oxidation occurs.³

MATERIAL AND METHODS

Bioleaching Tests



Figure 1 Bioleaching tests during the process.

Source: Author.

Native *Acidithiobacillus ferrooxidans* microorganisms were used. Laboratory tests were carried out in 500 ml Erlenmeyer flasks where 5, 10, 15 and 20 % V/V inoculate concentrations were evaluated and four inducer (Fe^{+2}) concentrations: 2, 4, 6 and 8 g/L. The initial temperature and pH were made were 30°C and 1,8 respectively, the particle size of the concentrated mineral was 185 mesh or 64 μm and pulp density of 15 % w/V. The determined parameters were: pH, Eh, bacteria number, and concentration measurement of: total iron, Fe^{+2} and sulphates. In addition the cyaniding process was evaluated through the atomic absorption in order to determine the higher gold recovery of the tests.

Analytical determinations

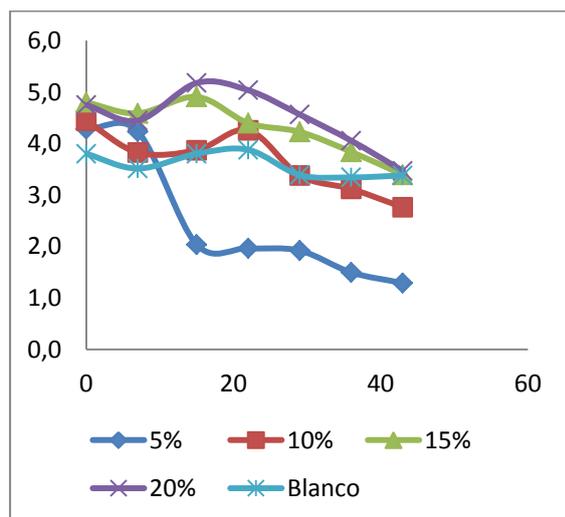
The ferrous ion was determined by Muir's method, which is based on the formation of a colored complex between Fe^{2+} and 1.10 phenanthroline, measured at 510 nm. The total iron was calculated by reduction of Fe^{3+}

with *hydroxylamine chloride* by the resulting measurement of Fe^{2+} . The sulphate ion was determined through the turbidimetric method, by precipitation in an acid medium of barium chloride crystals measured at 520 nm.

The cyaniding process was evaluated by an atomic absorption method in order to know the concentration of the recovered gold.

RESULTS

Determination of the best inoculum concentration of the Portovelo bacterial consortium.

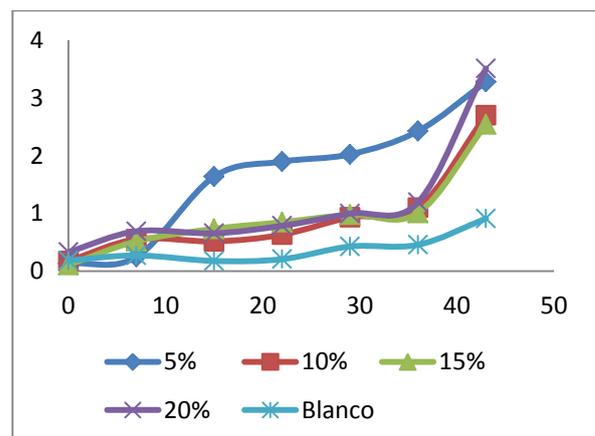


Graph 1 Concentration of Fe^{2+} during the bio-oxidation when varying the inoculum concentration.

According to Graph 1, the process is characterized by showing a slight increase in the concentration and a decrease in the bioleaching speed. In addition, in this graph it is observed that the oxidation profiles are very similar for the 10, 15 and 20 % concentrations,

the 5 % inoculum concentration showed a low oxidation profile.

The bio-oxidation profiles presented correspond to autocatalytic reactions in which an increase of the initial speed is due to an increase of the population and consumption of nutrients, then there is a decrease in speed because they begin to remove the pyrite and reach the tolerance limits of the microorganism, about 20 g/L. Regarding the inoculum concentration of 5%, it shows lower levels because the iron has been consumed completely.⁴

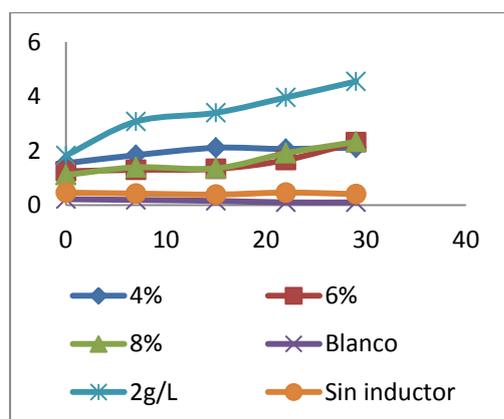


Graph 2 $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ ratio varying inoculum concentration.

Graph 2 shows the $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ ratio in which the inoculum concentration profile of 5% occurs with greater speed and magnitude, the other concentrations do not present a high , as based on the time they do not have a high $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ ratio that provides to the leaching medium a high oxidative capacity. This reason

is dependent on the oxidative capacity of the system that predominates for the oxidation of ferrous ion compared to oxidation by dissolved oxygen, a fact which can assure comparing the graph.

Determination of the best inducer (Fe^{+2}) concentration of the Portovelo bacterial consortium.



Graph 3 Concentration of Fe^{+3} during the bio-oxidation when varying the inducer (Fe^{+2}) concentration

The evaluation of the tests was made by proving three different inducer (Fe^{+2}) concentrations from 4, 6, 8 g/L, consequently it included two controls, the first one is a blank which does not have inducer and inoculums, and the second one is a sample that only has inoculum, in addition, it includes the concentration of 2 g/L tested in the objective previously described.

As shown in graph 3 the profiles of oxidation to Fe^{+3} where the inducer (Fe^{+2}) concentrations of 6 to 8 g/L are similar to each other; the profile of the inducer concentration

of 2 g/L tends to be greater to the previous ones. Also, the evaluated blank and the test with inoculums showed low oxidation profiles; the first one demonstrates little or null mineral oxidation capacity, whereas the second one demonstrates that in spite of its oxidation capacity, it is not significant, confirming that the use of an inductive agent is necessary for bio-oxidation processes.⁵

Degree of extraction

The degree of iron extraction and the volumetric productivity (Q_p) were modeled, the results are shown in the following table using such maximum and minimum levels of the used factors in the Table 1.

Concentration inoculo (X1)	Concentration inducitor	Fe total	Concentration total Fe g/L	iron extracted	Degree of extraction of iron
		0,1638			
5	2	24,57	3,655	14,88	0,149
10	2	24,57	6,674	27,16	0,272
15	2	24,57	8,043	32,73	0,327
20	2	24,57	10,348	42,12	0,421

Table 1 Degree of extraction

The coefficients of multiple regression based on the quadratic equation used previously in the productivity are shown below:

	GE Iron
b0	0,301
b1	0,131
b2	-0,01
R²	0,991

Table 2 Coefficients of productivity when varying inducer (Fe^{+2})

In the extraction degree of iron, the effect that occurs is linear; the concentration, adjusted to a 95 % confidence level and $R^2 = 0.99$ shows that approximately 99 % of the variability of the degree of iron extraction is explained by this equation and as shown in table 2.

$$0,045 + 0,013x_1 - 0,006x_1^2$$

Consequently the obtained results indicate that the inoculum concentration causes a greater effect than the inducer concentration on the bio-oxidation of refractory gold minerals. Obtaining 42.12 % of iron extracted from the mineral.

Cyaniding tests for gold recovery

Sample	Weight (g)	Total lime (g)	Total CN (g)
B	29,11	0,55	0,301
4	29,22	4,38	0,300
6	29,59	4,74	0,294
8	30,22	4,01	0,288

Table 3 Cyaniding of the samples

Table 3 shows the total consumption of lime and cyanide (CNNa) during the cyaniding process.

After cyaniding the bioleached tests, the results obtained from the atomic absorption procedure are shown in table 4

Sample	Conc Au liq (mg/L)	Conc. Au suel (mg/Kg)	Entrance (head)	Solution	Tailing	Yield
B	0,31	0,7	0,11	0,03	0,02	25,90
4	0,47	0,96	0,11	0,04	0,03	38,95
6	0,49	1,07	0,11	0,04	0,03	39,68
8	0,50	1,08	0,11	0,04	0,03	39,57

Table 4 Yields of Gold recovery

CONCLUSIONS

Once bio-oxidation tests were carried out, the best inoculum concentration determined was 20% volume/volume.

The optimal inducer (Fe^{+2}) concentration found after tested the bio-oxidation process is 2 g/L, if the concentration increases inhibitory effects can appear.

The maximum productivity (Q_p) with the values of inoculum concentration and inducer of 20% and 2 g / L respectively, both iron and sulfate had better results than other tests, with 0.241 g / L dia for iron and 0.295 g / L dia to sulfates.

The best degree of iron extraction is given by 42 %, with conditions of 2 g/L of inducer concentration and 20 % V/V of inoculum concentration. This fact indicates that this innovating process of gold recovery is favorable.

After making the process of Cyaniding to the bio-oxidation samples a 40 % of yield of gold recovery are obtained approximately.

After evaluation of the proposed parameters can indicate with certainty that the bio-oxidation is a favorable process for the recovery of refractory gold tailings from the mining area of Portovelo.

REFERENCES

1. MUQING QIU, G. W., WEIMINZHANG AND SHUIYING XIONG,, Optimizing conditions for bacterial leaching of copper from discarded mines. *Journal of University of Science and Technology Beijing* **2006**,13, 108.
2. F. GORDILLO, J. P. S., V. SANMARTÍN, P. AGUIRRE, J.C. GENTINA, E. DONATI, Mineralogical characterization of a polymetallic concentrate Portovelo mining district. Bioleaching by a native bacterial consortium, *Advanced Materials Research. Scientific* **2009**,71-73 481, 484.
3. MERRUANE, G. Oxidación bacteriana de sulfato ferroso con *Acidithiobacillus ferrooxidans*. Universidad de Chile, Santiago, 2002.
4. JONES C., K. D., Growth of *Thiobacillus ferrooxidans* on ferrous iron in chemostat culture: influence of products and substrate inhibition. *Journal Chem. Technol. Biochnol* **1983**,33B, 241-261.
5. PINA P.S., L. V. A., SILVA C.A., DAMAN D., FRENAY J., The effect of ferrous and ferric iron on sphalerite bioleaching with *Acidithiobacillus sp.* *Minerals Engineering* **2005**, 2-3.